

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Catecolaminas cerebrales y sistema endocrino**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**M. Luisa Leret Verdú**

DIRECTOR:

**Arsenio Fraile Ovejero**

**Madrid, 2015**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310028138

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

CATECOLAMINAS CEREBRALES Y SISTEMA ENDOCRINO

V<sup>2</sup> B<sup>2</sup>

El Director,

M<sup>c</sup> L. J.

*[Signature]*

MA LUISA LERET VERDU

MADRID, 1.983



R. 26.740

El presente trabajo ha sido realizado en la Cátedra de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Profesor D. Arsenio Fraile Ovejero, a quien va dirigido mi agradecimiento por su constante asesoramiento, ayuda e interés.

Asimismo, deseo expresar mi gratitud a la Dra. Esperanza Martinez-Conde por su consejo, cariño y aliento.

A la Dra. Rosa M<sup>a</sup> Arahuetes y a la Prof. Maite Antonio por su paciente y eficaz ayuda.

Por último, agradezco a todas las personas que me han ayudado de alguna manera, cuya enumeración sería larga y correría el riesgo de olvidar, inadvertidamente, algún nombre. Por ello, mi gratitud a todos por su colaboración.

## INDICE

INTRODUCCION .....	1
1. Noradrenalina y Dopamina como neurotransmisores en el cerebro .....	2
1.1. Vías dopaminérgicas en el sistema nervioso central .....	6
1.1.1. Sistema dopaminérgico nigroestriado...	6
1.1.2. Sistema dopaminérgico mesolímbico.....	7
1.1.3. Sistema dopaminérgico mesocortical....	7
1.1.4. Sistema dopaminérgico tuberoinfun- dibular .....	8
1.2. Vías noradrenérgicas en el sistema nervioso central .....	9
2. Biosíntesis e inactivación de las catecolaminas...	11
3. Farmacología de los neurotransmisores .....	19
3.1. Administración intraventricular de cateco- laminas .....	21
3.2. Agonistas y antagonistas de las catecola- minas .....	23
3.2.1. Agonistas .....	26
3.2.2. Antagonistas .....	28
4. Procesos patológicos que cursan con alteraciones de los niveles de DA y NA .....	30
5. Catecolaminas y sistema endocrino .....	33
5.1. Glándulas adrenales .....	36
5.1.1. Monoaminas en el control de las fun- ciones hipofisopararrenales .....	40

5.1.2. Adrenalectomía .....	45
5.2. Tiroides .....	48
5.2.1. Catecolaminas en el control de las funciones tiroideas .....	49
5.2.2. Hipotiroidismo y tiroidectomía .....	50
5.3. Gonadotropinas .....	53
5.3.1. Catecolaminas en el control de la secreción de gonadotropinas .....	54
5.3.2. Otros reguladores de la secreción de gonadotropinas .....	59
5.4. Eje Hipotálamo-hipófisis-ovario .....	61
5.4.1. Catecolaminas y función ovárica .....	65
5.4.2. Ovulación .....	67
5.4.3. Ciclo estral .....	68
5.4.4. Ovariectomía .....	69
5.5. Eje Hipotálamo-hipófisis-testículo .....	71
5.5.1. Células de Leydig .....	71
5.5.2. Tubos seminíferos .....	73
5.5.3. Prolactina en el macho .....	74
5.5.4. Catecolaminas y esteroides androgé- nicos .....	75
5.5.5. Orquidectomía .....	77
OBJETIVO DEL TRABAJO .....	79
MATERIAL Y METODOS .....	80
1. Planificación experimental .....	81
2. Animales .....	83
2.1. Anestesia .....	83
2.2. Adrenalectomía .....	83

2.3. Gonadectomía .....	84
2.3.1. Ovariectomía .....	84
2.3.2. Orquidectomía .....	85
2.4. Tiroidectomía .....	85
3. Reactivos y Aparatos .....	86
4. Extracción y disección del encéfalo .....	90
4.1. Material necesario .....	90
4.2. Extracción del encéfalo .....	90
4.3. Aislamiento del diencéfalo .....	91
5. Estudios bioquímicos .....	92
5.1. Obtención del tejido para la determinación de aminos (DA, NA) .....	92
5.1.1. Material .....	92
5.1.2. Método .....	92
5.2. Estándares .....	93
5.3. Valoración de proteínas .....	94
5.3.1. Fundamento .....	94
5.3.2. Reactivos .....	94
5.3.3. Procedimiento .....	95
5.4. Ensayos fluorimétricos para cuantificar las catecolaminas (DA, NA) .....	96
5.4.1. Bases teóricas del proceso de fluores- cencia .....	96
5.4.2. Ensayo fluorimétrico de dopamina ....	97
5.4.2.1. Material .....	99
5.4.2.2. Técnica .....	100

5.4.3. Ensayo fluorimétrico de noradrenali-	
na .....	105
5.4.3.1. Material .....	107
5.4.3.2. Técnica .....	107
6. Métodos estadísticos .....	112
RESULTADOS .....	116
DISCUSION .....	169
CONCLUSIONES .....	189
BIBLIOGRAFIA .....	192

## INTRODUCCION



## 1. NORADRENALINA Y DOPAMINA COMO NEUROTRANSMISORES EN EL CEREBRO.

Las catecolaminas noradrenalina y dopamina están localizadas en sistemas neuronales específicos, en el cerebro (Dahlström y Fuxe, 1.965; Fuxe, 1.965).

En 1.956 Von Euler definió a la noradrenalina(NA) como el neurotransmisor adrenérgico del SNC de casi todos los vertebrados. En cambio, la adrenalina(A) es el neurotransmisor predominante en anfibios, tanto en el cerebro como en los tejidos periféricos.

Carlsson (1.958), Bertler y Rosengren (1.959) demostraron la presencia, en el cerebro de mamíferos, de altas concentraciones de dopamina (DA), en los ganglios basales y en algunas estructuras asociadas a ellos. Al mismo tiempo encontraron en estas áreas baja concentración de NA, lo que hizo que se empezara a abandonar la idea de que la única función de la DA era la de un metabolito intermedio entre tirosina y noradrenalina, sugiriendo por primera vez que la DA estaba involucrada en el control de las funciones motoras. En muchas áreas del cerebro la DA actúa presumiblemente como precursor de la NA, pero en otras regiones, en las cuales las concentraciones de DA son altas y los niveles de NA bajos, como el estriado y la eminencia media (EM) (Hillarp y col, 1966), la DA actuará como neurotransmisor.

La distribución cuantitativa de DA y de NA en diferentes partes del SNC del perro, gato y hombre fueron determinadas por Mc Lennan (1.963), siendo más tarde, por medio de ensayos de fluorescencia, estimadas las cantidades relativas de las aminas en el cerebro de la rata (Fuxe, 1.965). La DA

y la NA aparecen en el cerebro de la rata fetal a los 15 días de gestación, al igual que las enzimas involucradas en las biosíntesis de ambas, como la tirosina hidroxilasa, la dopa descarboxilasa y la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (Coyle y Henry, 1.973).

En ese momento los niveles de las dos catecolaminas son del 2% de los niveles del adulto, mientras que las enzimas biosintéticas tienen una actividad específica de alrededor de un 1% de la del cerebro adulto. Sin embargo, durante el desarrollo postnatal las enzimas biosintéticas y sus productos incrementan de una forma paralela (Breese y Traylor, 1.972; Lamprecht y Coyle, 1.972).

Estudios realizados sobre el efecto de los inhibidores de la tirosina hidroxilasa y de la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa sugieren que las neuronas catecolaminérgicas pueden ser fisiológicamente activas a los 18 días de gestación (Coyle Axelrod 1.971, 72 a,b; Lamprecht y Coyle, 1.972) y estudios de comportamiento sugieren que la funcionalidad de las sinapsis de neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas está desarrollada en el cerebro de la rata al nacer (Fibiger y col., 1.970; Mc Geer y col., 1.971).

Siendo las neuronas catecolaminérgicas centrales las responsables de un número de funciones importantes, entre las que se incluyen el control de los movimientos (Sourkes y col. 1.969), la modulación de la liberación de ciertas hormonas hipofisarias (Wurtman, 1.971) y las alteraciones de ciertos estados afectivos (Schildkraut y Kety, 1.967; Snyder, 1.972), no puede ser sorprendente que tengan que actuar como tal al principio del estado de desarrollo.

La distribución regional de las catecolaminas en el cerebro de la rata recién nacida está correlacionada con la actividad de las enzimas biosintéticas (Coyle y Axelrod, 1.972; Lamprecht y Coyle, 1.972) así como con la densidad de la innervación por las neuronas catecolaminérgicas, proceso que es documentado por la técnica histofluorescente (Loizou, 1.972).

Las regiones próximas a los cuerpos de las neuronas catecolaminérgicas desarrollan su innervación más rápidamente que otras regiones que están más distantes. Por ejemplo el cerebelo, el cual está situado cerca del "locus coeruleus" (origen o fuente de innervación catecolaminérgica) posee al nacer un nivel de NA y una actividad específica de las enzimas (Tirosina hidroxilasa y DA  $\beta$ -hidroxilasa) la mitad de la que presenta en la rata adulta. Por el contrario, en la corteza parietal, tanto la NA como las actividades enzimáticas incrementan unas 10 veces desde la rata neonata hasta el adulto (Coyle y Henry, 1.973).

En el cerebro tanto de rata fetal como neonata hay evidencias farmacológicas y anatómicas de que la NA y la DA están localizadas en diferentes poblaciones neuronales (Loizou, 1.972; Ungerstedt, 1.971). Estudios farmacológicos del cerebro de rata fetal indican que las neuronas catecolaminérgicas inmaduras tienen propiedades en común con las neuronas maduras (Iversen, 1.967; Goldstein y Nakajima, 1.967): 1) Las aminos están localizadas en lugares de almacenaje sensibles a la reserpina, 2) La MAO juega el mayor papel en el catabolismo de las aminos y 3) Si se produce inhibición de la tirosina hidroxilasa hay un decremento de un 40% de los niveles de DA y de NA a las 3 horas, lo que sugiere que ambas aminos tenían una vida media de 3 horas, similar a lo ob-

servado en el cerebro adulto.

El % mayor de la actividad total de la enzima tirosina hidroxilasa aparece post-natalmente, con diferencias claramente regionales, evidentes en el curso de la maduración (Björklund y Nobin, 1.973). Del mismo modo, el mayor incremento de los niveles de DA y NA ocurre post-natalmente, concomitantemente con una proliferación de axones y dendritas de las neuronas y una formación activa de mielina en esta etapa.

En el cerebro de la rata hay un incremento de estas aminas a lo largo del desarrollo hasta valores adultos (Kellog y Wenneström, 1.974; Lengvari y col., 1.980; Srivastava y Kapoor, 1.979; Nomura y col, 1.976) y las tasas de incremento en la concentración de las monoaminas difieren entre las distintas partes del cerebro.

Las neuronas noradrenérgicas están presentes en el cortex y en el tallo cerebral a los 4 días de edad, coincidiendo con el desarrollo de los receptores postsinápticos, mientras que en el diencéfalo no aparecen hasta los 28 días de edad (Kellog y Wenneström, 1.974).

Las neuronas dopaminérgicas aparecen en el estriado y en el diencéfalo a los 4 días de edad, pero la ontogenia de los receptores de la DA y/o el control feedback desde los receptores postsinápticos parecen variar con la maduración (Kellog y Wenneström, 1.974).

Los receptores presinápticos de la DA maduran varias semanas despues en la región mesolímbica que en el estriado (Shalaby, 1.981). Parece ser que la transmisión noradrenérgica madura más rápidamente que la dopaminérgica (Kellog y Wenneström, 1.974).

### 1.1. VIAS DOPAMINERGICAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Hoy en día se conocen cuatro sistemas dopaminérgicos bien definidos en el cerebro de la rata. La vía nigroestriada y la mesolímbica tienen su origen en los núcleos mesencefálicos y fueron establecidas detalladamente por Ungerstedt (1.971). La vía mesocortical es de descubrimiento más reciente; inerva determinadas áreas de la corteza cerebral, tales como la corteza frontal, corteza del cíngulo anterior y corteza entorrinal. Una cuarta vía, intrahipotalámica, acaba en la eminencia media. Estudios llevados a cabo sobre fetos humanos (Nobin y Björklund, 1.973), han permitido establecer en el cerebro del hombre una distribución de las vías dopaminérgicas muy similar a la encontrada en la rata.

#### 1.1.1. Sistema dopaminérgico nigroestriado.

La vía principal nigroestriada se origina en la zona compacta de la sustancia negra y sus fibras se agrupan en el área ventral del tegmento y llegan a inervar el neostriado y la porción central de la amígdala. Esta vía forma un conjunto denso de terminaciones muy finas y, aunque en la rata no inerva el globus pallidus, en embriones humanos se ha podido demostrar claramente la presencia de terminaciones en dicha estructura (Nobin y Björklund, 1.973). Esta vía es de gran importancia para el control de la función motora y hoy en día se estima que los efectos extrapiramidales que inducen los fármacos antipsicóticos, vienen mediados por sus acciones bloqueantes sobre los receptores dopaminérgicos de este sistema.

### 1.1.2. Sistema dopaminérgico mesolímbico.

Los axones parten de las proximidades del núcleo interpeduncular (núcleos A8 y A10 según la terminología de Dahlström y Fuxe, 1.964) y ascienden junto a los axones del sistema nigroestriado hasta la zona medial. A nivel de la comisura anterior se separa una vía ascendente que inerva fundamentalmente el núcleo accumbens y el núcleo intersticial de la estría terminal, mientras que una vía descendente inerva los tubérculos olfatorios.

La vía dopaminérgica mesolímbica tiene un importante papel en la regulación de diversas formas de conducta que se expresan mediante movimientos, y por otra parte, parece ser que las acciones específicamente antipsicóticas de los neurolepticos vienen mediadas más por interferencias con esta vía que con la nigroestriada.

### 1.1.3. Sistema dopaminérgico mesocortical.

La introducción de técnicas histoquímicas con ácido glioxílico ha permitido detectar terminaciones dopaminérgicas en la corteza cerebral. (Lindvall y col., 1.974) que hasta entonces habían pasado desapercibidas, si bien diversos hechos sugerían esta posibilidad. Thierry y col. (1.973) habían detectado cantidades apreciables de dopamina en la corteza cerebral de rata y observado la síntesis en la corteza de  $^3\text{H}$ -DA a partir de  $^3\text{H}$ -tirosina, capacidad que se perdía tras el aislamiento de esta área cerebral, lo cual indica un origen exocortical de estas terminaciones nerviosas y no la presencia de interneuronas dopaminérgicas (Glowinski y col.

1.973, 1.974).

La existencia de terminales dopaminérgicas en la corteza cerebral no es exclusiva de la rata, sino que se ha encontrado también en otras especies animales y en fetos humanos (Gessa y col., 1.974).

Las proyecciones de fibras dopaminérgicas a la corteza cerebral parten de los núcleos mesencefálicos y llegan a distintas áreas neocorticales: corteza frontal, corteza del cíngulo anterior, parte ventral de la corteza entorrinal y a la zona de transición entre el neocortex y el cortex piriforme, a lo largo de la fisura rinal. Los resultados obtenidos por Fuxe y col. (1.974), complementan los obtenidos por Lindvall respecto a la distribución de las fibras dopaminérgicas de la corteza límbica y frontal de la rata. Por lo que se refiere a su morfología (Berger y col., 1.974), se trata de fibras finas y sinuosas con largos segmentos lisos, interrumpidos de modo irregular por dilataciones fusiformes.

La importancia funcional de esta vía mesocortical no está aún establecida, pero se piensa que debe ser enorme si se tienen en cuenta las funciones integrativas de la corteza. Es sobradamente conocida la participación de la corteza frontal en la génesis de formas complejas de comportamiento y cabe por tanto suponer la importancia de esta vía en la etiología de la esquizofrenia y en la acción de los fármacos antipsicóticos.

#### 1.1.4. Sistema dopaminérgico tuberoinfundibular.

Los cuerpos neuronales se han localizado en el hipotálamo e inervan la eminencia media. Las neuronas dopaminérgicas

gicas de este sistema son algo distintas de las que originan los sistemas anteriores; por ejemplo son insensibles a la destrucción por 6-hidroxidopamina. Posiblemente actúen como neuronas neurosecretoras, estando implicadas en el control de la secreción del complejo hipotálamo-hipofisario. La dopamina controla directamente la secreción del PIF (factor inhibidor de prolactina) e incluso es posible que el PIF sea la dopamina. La dopamina regula también parcialmente la secreción de gonadotropinas y de hormona del crecimiento.

Los sistemas dopaminérgicos cerebrales están, por otra parte, conectados con otros sistemas de neurotransmisión central que pueden, lógicamente, modular su actividad. La interacción entre sistemas dopaminérgicos y otros sistemas de neurotransmisión se ha estudiado fundamentalmente a nivel del eje nigroestriado, en donde parecen actuar al menos tres sistemas: uno dopaminérgico, otro colinérgico (ACh) y otro gabaérgico (GABA).

## 1.2. VIAS NORADRENERGICAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La morfología de estas neuronas corresponde al tipo integrante de la sustancia reticular (Scheibel y Scheibel, 1967), con axones largos que alcanzan áreas cerebrales distantes. De los axones se originan un gran número de redes colaterales mediante las que se propaga y extiende su actividad nerviosa hasta prácticamente todas las partes del cerebro.

Las vías noradrenérgicas descendentes se originan principalmente en las neuronas NA de la sustancia reticular del bulbo, e inervan la sustancia gris de la médula espinal; su función es vegetativa-simpática, tal como lo son las vías



que terminan en las columnas laterales simpáticas de la médula dorso-lumbar, o bien intervienen en la regulación de reflejos motores. Otras vías cortas participan en funciones específicamente bulbares, tal como la regulación de la presión arterial, la actividad respiratoria, etc.

Las vías NA ascendentes son dos: dorsal y ventral. La dorsal tiene su principal origen en el "locus coeruleus", camina por la región dorso-medial de la formación reticular del mesencéfalo, e inerva de forma más o menos exclusiva las áreas corticales del telencéfalo; llega al neocortex y al hipocampo. A lo largo de su curso da colaterales a los tubérculos cuadrigéminos superiores e inferiores. Al llegar al límite entre tálamo y mesencéfalo, la vía cambia de dirección hacia la zona subtalámica, hasta reunirse con la vía ventral en el fascículo prosencefálico medial. El fascículo llega hasta las áreas neocorticales, vía cápsula interna, o da la vuelta hacia atrás hasta el cíngulo, dejando a un lado el área septal y el hipocampo. Se detectan redes finas NA en todas las capas del neocortex, sobre todo en las más externas. Además, el locus coeruleus envía inervación al cerebelo, en donde se aprecian terminaciones NA, siendo posible que una misma neurona del locus coeruleus pueda inervar el neocortex, la formación hipocámpica y la corteza cerebelosa. Es evidente que este sistema neuronal puede influir de modo inmediato sobre todas las áreas corticales del cerebro y, por tanto, es de gran importancia en la regulación de la capacidad que las áreas corticales tienen para responder a los diversos estímulos, así como en los mecanismos de atención que actúan en la corteza.

El origen de la vía NA ventral es menos específico; prácticamente contribuyen a ella todos los grupos celulares

de la protuberancia y bulbo, incluidas las células que envían prolongaciones descendentes. Inerva principalmente el hipotálamo, el área preóptica, el área de la estría terminal y el área septal. Es una vía con gran participación en las funciones neuroendocrinas y vegetativas. La vía NA ventral llega hasta el fascículo prosencefálico medial caminando entre el lemnisco medio y el núcleo interpeduncular, pasando por medio de la formación reticular ventro-lateral del mesencéfalo, a lo largo de la superficie dorsal del lemnisco medio. Antes de llegar al fascículo prosencefálico medial pasa a través del área ventral del tegmento, en donde las fibras se unen en gran número a los axones dopaminérgicos nigro-estriados. Esta vía constituye un sustrato fundamental en la interrelación funcional entre la formación reticular del tronco cerebral y las áreas límbicas prosencefálicas.

## 2. BIOSINTESIS E INACTIVACION DE LAS CATECOLAMINAS.

La DA y la NA son sintetizadas a partir de la tirosina, que es absorbida por el pie terminal desde la circulación por un mecanismo de transporte activo y transformada en las neuronas en dihidroxifenilalanina (L-Dopa) por la enzima tirosina hidroxilasa. Esta enzima utiliza el oxígeno molecular y la pteridina reducida como cosustrato y cofactor respectivamente (Nagatsu y col., 1.964). Algún autor ha señalado que la fenilalanina puede ser también sustrato de la tirosina hidroxilasa, pudiendo formarse en el cerebro DOPA desde este sustrato (Kaufman, 1.974). Se ha demostrado la existencia de esta enzima en el cerebro, en las terminaciones simpáticas y en la médula suprarrenal, localizándose probablemente en el interior de las mitocondrias.

La dihidroxifenilalanina pasa de las mitocondrias al citoplasma, donde es inmediatamente descarboxilada a DA, por medio de la enzima dopa-decarboxilasa. Esta enzima no se encuentra localizada en ninguna partícula celular y es tan poco específica que incluso descarboxila aminoácidos sintéticos como la  $\alpha$ -metil dopa, formándose la  $\alpha$ -metildopamina, sustancia a la cual se atribuye la acción hipotensora de la  $\alpha$ -metil dopa.

La DA es un neurotransmisor propio, además de ser un precursor de la NA, que es formada por  $\beta$ -hidroxilación de la DA, la cual entra en los granos cromafines o vesículas y, por medio de la enzima dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH), es convertida en NA; esta enzima tampoco tiene una gran especificidad de sustrato y cataliza también la oxidación de otras aminas. Está localizada en los granos cromafines de la médula suprarrenal y en las vesículas sinápticas.

Por último, la feniletanolamina-N-metil transferasa cataliza la transformación de NA en adrenalina. Transfiere un grupo metílico, de la S-adenosil metionina al grupo amínico de la NA. En los mamíferos esta enzima se encuentra casi exclusivamente en la médula suprarrenal.

Es necesario, para que la NA se transforme en A, que salga de los granos cromafines y pase al citoplasma.

La adrenalina, una vez formada, vuelve a los granos cromafines, en donde es almacenada hasta su liberación. Se han encontrado en el cerebro pequeñas cantidades de adrenalina y de la enzima feniletanolamina-N-metil transferasa (Koslow y Schlumpz, 1.974; Pohoreck y col., 1.969; Saavedra y col., 1.974) sugiriéndose que algunas neuronas cerebrales pueden sintetizar y liberar esta catecolamina.



Una vez fabricadas las moléculas del transmisor, se almacenan en el pie terminal del axón, en unos minúsculos sacos delimitados por una membrana, llamadas vesículas sinápticas, donde se hallan asociadas a proteínas de almacenamiento.

Estas mismas estructuras también se observan en la médula suprarrenal y en otros tejidos cromafines.

En un sólo pie terminal hay millares de vesículas sinápticas y cada una de ellas contiene entre 10.000 - 100.000 moléculas del transmisor. Las catecolaminas, en estas formas de depósito, se encuentran protegidas de la acción de las enzimas situadas dentro del pie terminal.

En los sistemas dopaminérgicos y noradrenérgicos hay que distinguir dos poblaciones funcionalmente distintas de una misma sustancia: un pequeño acúmulo fácilmente liberable (que representa la amina nuevamente sintetizada) y el resto de la sustancia en consideración, que goza de menor movilidad y constituye el producto almacenado (McMillen y Shore, 1978).

Cuando la neurona es estimulada hay una entrada de iones  $Ca^{++}$ , lo cual induce la liberación de DA o de NA a la hendidura sináptica para actuar como transmisor. El mecanismo de la liberación no está muy claro; algunos investigadores apoyan la teoría de que las vesículas sinápticas se fusionan directamente con la membrana presináptica y descargan su contenido en el espacio sináptico, mientras que otros dicen que se liberan las moléculas del transmisor a través de unos canales especiales. Las moléculas de transmisor liberadas cruzan velozmente el espacio sináptico, lleno de líquido, y se unen a receptores específicos de la membrana postsináptica.

tica. Los receptores están constituidos por moléculas de proteínas de gran tamaño que sobresalen por encima y por debajo de la membrana. Una región de la superficie de la proteína receptora tiene la misma forma y configuración que la molécula del transmisor, encajándose ésta en ese lugar. Al unirse el transmisor con esta región del receptor hay un cambio de configuración de la proteína receptora iniciándose así la respuesta fisiológica específica. El tiempo que tarda en producirse esta respuesta varía desde una fracción de segundo (contracción del músculo voluntario) hasta un lapso de tiempo de minutos o incluso horas, como es la secreción de una hormona.

La proteína receptora de la NA o de la DA está acoplada, dentro de la membrana de la célula diana, a la enzima adenil-ciclase, que cataliza la conversión del adenosintrifosfato (ATP) en AMP cíclico. La adenil-ciclase suele estar inactiva, pero cuando el transmisor se une al receptor postsináptico, la enzima se pone en marcha automáticamente y hay una rápida conversión de ATP en AMP cíclico en el interior de la célula. A continuación éste actúa sobre la maquinaria bioquímica de la célula, iniciándose la respuesta fisiológica característica del transmisor. Una vez transmitido su mensaje, el AMP cíclico se inactiva en el interior de la célula por medio de la enzima fosfodiesterasa.

Debido a que el sistema del segundo mensajero funciona de un modo relativamente lento, parece ser más adecuado para explicar acciones de más larga duración de los transmisores en el cerebro. Podría decirse que existen dos tipos básicos de receptores de los transmisores: los receptores de acción rápida, que participan en la transmisión de la in-

formación controlando el estado de la permeabilidad de un poro iónico, y los receptores de acción más duradera, que inducen la formación de una sustancia a segundo mensajero (Iversen, 1.980).

Se ha demostrado que la DA actúa sobre dos tipos diferentes de receptores en el cerebro: los receptores  $D_1$ , que están acoplados a un sistema de segundo mensajero con AMP cíclico, y los receptores  $D_2$  que no poseen dicho acoplamiento (Van Rossum, 1.966; Iversen, 1.975; Woodruff, 1.971). Por otra parte se ha sugerido la participación de otro nucleótido cíclico, el monofosfato de guanosina cíclico (GMP cíclico), como posible mediador de los efectos de la NA en los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, distintos a los  $\beta$ -adrenérgicos asociados al sistema AMP cíclico (Nathanson y Greengard, 1.980).

La inactivación de las catecolaminas fisiológicas se lleva a cabo a través de dos procesos fundamentales: a) transformación, por un mecanismo enzimático, en productos prácticamente inactivos y b) por recaptura del neurotransmisor en el terminal nervioso presináptico.

Las catecolaminas son transformadas extracelularmente por la catecol-O-metil-transferasa (COMT) en compuestos biológicamente inactivos, que son eliminados por la orina, que parece ser la única vía de excreción. Esta enzima, en presencia de  $Mg^{++}$  y otros cationes divalentes, transfiere el grupo metílico de la S-adenosil-metionina, al grupo hidroxílico en posición 3 del núcleo catecol.

Si bien la COMT desempeña un importante papel en la inactivación de las catecolaminas, los estudios que se han realizado administrando catecolaminas marcadas con isótopos han demostrado la importancia de la captación de los neuro-

transmisores por las terminaciones nerviosas; estos pueden ser reciclados dentro de las vesículas sinápticas, o bien inactivados intracelularmente por la enzima monoaminoxidasa (MAO), la cual se encuentra en la membrana externa mitocondrial y actúa, por tanto, intraneuronalmente. Se distinguen dos formas de la MAO, la A y la B, según el sustrato sobre el que actúan y sus inhibidores. La NA es desaminada por la forma A mientras que la DA lo es por los dos tipos de MAO (Urwyler y Von Wartburg, 1.980).

La limitación de la velocidad de la síntesis está en el paso catalizado por la tirosina hidroxilasa (Levitt y col. 1.965). Esto está apoyado por su actividad "in vitro", que es inferior a la de todas las demás enzimas que intervienen en la biosíntesis, y por su notable especificidad; así, se ha visto que la concentración de tirosina en los terminales nerviosos es unas 100 veces superior a la de NA o de DA y sólo una pequeña proporción de la tirosina es transformada en el neurotransmisor. Wise y col. (1.977) exponen la posibilidad de que la biosíntesis de NA en el cerebro no sea sólo regulada por la tirosina hidroxilasa sino también por la DBH. Naturalmente otros factores pueden influir también en la velocidad de síntesis; por ejemplo la disponibilidad de sustrato (nivel de tirosina circulante), la presencia de coenzimas y la integridad estructural de las partículas intracelulares que intervienen en el proceso. También hay que considerar que si se libera en el espacio sináptico una cantidad excesiva del neurotransmisor, se reactivarán los receptores presinápticos, situados en el terminal del axón, lo que provoca inhibición de la síntesis del transmisor a través de un mecanismo de retroalimentación. Así, varios estudios in vitro demostraron que la actividad de la tirosina hidroxilasa era inhibida por catecol y catecolaminas; esta



inhibición era competitiva con el cofactor de pteridina (Ikeda, 1.966; Undenfriend, 1.965). Hay otras hipótesis en las que propugnan que las catecolaminas inhiben la hidroxilación indirectamente por medio de recptores (Carlsson, 1.972; Cloutier, 1.973).

La síntesis de los neurotransmisores puede estar influída por agentes que afectan a la concentración o a la actividad de las enzimas. De hecho, se han realizado muchos estudios en los que, por medio de agentes farmacológicos, se interfiere la síntesis o el metabolismo de las monoaminas. Estos agentes pueden actuar bien inhibiendo la síntesis, o estimulando o inhibiendo a los neurotransmisores, o bloqueando o activando los receptores.

La inhibición de la síntesis o el bloqueo de las enzimas, perjudica la transformación de una de las aminas o de sus precursores en otras aminas, como en el caso, por ejemplo, de la  $\alpha$ -metil-paratirosina, que sustituye a la tirosina, inhibe a la tirosina hidroxilasa y bloquea así la síntesis de DA y NA. La  $\alpha$ -metildopa se transforma en monoaminas metiladas que funcionan como falsos neurotransmisores cuando son secretadas.

El disulfiran, el ácido fusárico, producen una alteración específica en la síntesis de un neurotransmisor, ya que inhibe la DBH, bloqueando así el paso de DA a NA. El FLA 63 es también un inhibidor selectivo de la DBH, el cual a dosis altas reduce la NA cerebral (Corrodi y col. 1.970; Anden y Fuxe, 1.971).

La función neurotransmisora se puede modificar si se sobrecarga el sistema con uno de sus precursores. Así, dando sistemáticamente triptófano, por ejemplo, puede resultar

que las terminaciones nerviosas que normalmente contenían DA o NA produzcan serotonina, y cuando la neurona fuera estimulada segregaría serotonina en vez de DA o de NA (Awazi y Guldberg, 1.978). Esta falta de discriminación por las neuronas causa confusión, sobre todo cuando se sabe que un determinado neurotransmisor está involucrado en un sistema hormonal determinado.

### 3. FARMACOLOGIA DE LOS NEUROTRANSMISORES.

Se puede disminuir la actividad de las neuronas monoaminérgicas con fármacos, como la reserpina, que interfieren la síntesis de sus neurotransmisores. Por el contrario, la imipramina y la amitriptilina bloquean la recaptura de las monoaminas por las terminaciones presinápticas, incrementando así la cantidad de neurotransmisor que se une a los receptores postsinápticos; la triptolina inhibe en menor grado la recaptura de NA y de DA en el hipotálamo (Rommelspacher y col., 1.978). Al parecer, también la cocaína funciona por el mismo mecanismo (Hadfield y col., 1.980). Estos hechos hacen pensar que los bajos niveles de aminas en las sinapsis cerebrales pueden ser los causantes de la depresión, mientras que la manía estaría relacionada con niveles excesivamente altos.

Otro grupo de fármacos actúan estimulando la descarga de un neurotransmisor dado, como la d-anfetamina y la metilamfetamina, que provocan la liberación de DA y de NA, respectivamente (Von Voigthlander y Moore, 1.973; Gudelsky y col, 1.974).

También se puede potenciar el efecto de un neurotransmisor bloqueando su degradación; por ejemplo, la iproniazida

y otras muchas sustancias inhiben la MAO, que degrada la NA, la DA y la 5HT; la apomorfina inhibe la desaminación de la DA, específicamente (Leitz y col., 1.971), y lo mismo actúa la pargilina (Wiesel y col., 1.973; Wilck y col., 1.974, 1.975). Todos estos fármacos acentúan los efectos estimulantes de dichas aminas y son, por lo tanto, antidepresivos.

La función neurotransmisora resulta también afectada cuando se actúa sobre los receptores de la membrana postsináptica mediante fármacos que los activan o los bloquean. Si su configuración molecular es semejante a la del neurotransmisor natural, se une al receptor y suele producir la misma acción que éste; son los fármacos llamados "agonistas" o activadores de los receptores. Así, la apomorfina y la  $\alpha$ -bromocriptina activan los receptores dopaminérgicos, la fenilefrina los  $\alpha$ -adrenérgicos y el isoproterol los  $\beta$ -adrenérgicos. Si la semejanza del fármaco no es tan acentuada como en el caso de los activadores, se une también al receptor pero no lo activa e impide que el neurotransmisor natural se combine con él; son, pues, inhibidores competitivos de los neurotransmisores. Entre los bloqueantes sinápticos por este mecanismo tenemos la fentolamina, para los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, el propranolol para los  $\beta$ -adrenérgicos, y el haloperidol para los dopaminérgicos. La especificidad de acción de algunas sustancias de este tipo no es muy marcada y, así, la clorpromazina y muchas fenotiazinas bloquean tanto los receptores dopaminérgicos como los noradrenérgicos y los triptaminérgicos (Frohman, 1.980). Es claro que la terapéutica ha sacado partido de este mecanismo de acción de tales sustancias; por ejemplo, la clorpromazina y el haloperidol se utilizan en el tratamiento de la esquizofrenia por su acción bloqueante de los receptores dopaminérgicos en el

cerebro. No obstante, hay que tener en cuenta que el bloqueo de un receptor puede provocar un incremento del número de ellos, apareciendo así fenómenos de tolerancia (Scatton, 1.977 Leelavathi y col. 1.980).

Finalmente tenemos un grupo de fármacos que actúan sobre el AMP cíclico, como las metilxantinas, que inhiben a la fosfodiesterasa y aumentan, por tanto, la cantidad de AMP cíclico que se genera en respuesta al neurotransmisor; dichas sustancias ejercen una ligera estimulación sobre el cerebro (Iversen, 1.980).

### 3.1. ADMINISTRACION INTRAVENTRICULAR DE CATECOLAMINAS.

La L-Dopa tiene, en general, potentes acciones motoras y autónomas, como son la conducta agresiva observada en animales de laboratorio, hipertensión, piloerección, eyaculación, transpiración y emesis. Además tiene acciones antireserpínicas; esto es interesante porque el reconocimiento del estado reserpinizado es el modelo farmacológico de la enfermedad de Parkinson.

La  $\alpha$ -metil-tirosina (AMT), inhibidor de la tirosina hidroxilasa, hace disminuir las concentraciones de las catecolaminas. Este decremento inducido por AMT está asociado con la sedación y la respuesta menor en el test de conducta condicionada. También disminuye la actividad locomotora espontánea, efecto éste que es invertido por la L-Dopa.

Dosis de DA y de NA inyectadas directamente en el estriado, o en el hipotálamo provocan hiperactividad motora (Benkert, 1.969; Benkert y Köhler, 1.972; Herman, 1.970) y se observa que el aumento de la actividad motora producido por la DA es más fuerte que el causado por la NA (Pijnen-

burg y col. 1.975).

La administración intracerebroventricular de NA puede causar dos tipos de respuestas según la dosis administrada, sobre la presión sanguínea. La respuesta hipotensiva es producida por bajas dosis de NA y parece estar mediada por receptores  $\alpha$ -adrenérgicos centrales, ya que se abolía por pretratamiento intracerebroventricular con pentolamina.

Igualmente la administración central de NA producía una respuesta bimodal, dependiente de la dosis, sobre la temperatura corporal. A bajas dosis causa hipertermia y a altas dosis hipotermia (Buccafusco y Brezenoff, 1.977).

La DA también ejerce, de una forma poco habitual, acciones cardiovasculares, lo que parece ser debido a un receptor específico vascular (Goldberg, 1.974).

El núcleo accumbens y el cuerpo estriado juegan un importante papel en el control de las funciones motoras. La administración de bajas dosis de DA en el núcleo accumbens produce un incremento en la actividad locomotora coordinada. Por el contrario, altas dosis de DA en el cuerpo estriado produce comportamiento estereotipado (Jackson y col, 1.977): la rata asume una postura significativamente asimétrica respecto del eje antero-posterior, con giro del costado contralateral al del estriado inyectado.

Generalmente la DA tiene una acción antidepresiva en el SNC.

Bajas concentraciones de DA en el tracto supraestriado en el hombre lleva a la enfermedad de Parkinson, una enfermedad en la cual la lesión patológica parece ocurrir en la sustancia negra. La interrupción de este tracto, así como

de ciertas fibras descendentes hacia el núcleo rojo, produce la hipoquinesia de los miembros contralaterales. (Ehringer y Hornykiewicz, 1.960; Hornikiewicz, 1.973).

Consideraciones neurofisiológicas y clinico-patológicas confirman también un papel inhibidor de la DA en el estriado.

### 3.2. AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE LAS CATECOLAMINAS.

Los agonistas y antagonistas de las catecolaminas (DA y NA) pueden actuar de una manera directa a nivel de los receptores monoaminérgicos, tanto presinápticos como postsinápticos (Carlsson, 1.978).

Hay evidencias a favor de un sistema de receptores presinápticos (Aghajanian y Bunney, 1.974; Starke y col. 1.977). Así, drogas antisicóticas, como las butirofenonas, bloquean la liberación de DA debido a la estimulación de los terminales presinápticos, evitando de este modo la propagación del impulso y la neurosecreción. La activación de los receptores presinápticos puede también inhibir la hidroxilación de la tirosina y no sintetizarse por lo tanto ni DA ni NA.

Pero el lugar de mayor acción de los agonistas y antagonistas de DA y NA es sobre los receptores postsinápticos. Estos receptores poseen una serie de propiedades que fueron señaladas por estudios clínicos, fisiológicos y farmacológicos y son las siguientes:

a) Son estimulados bien por la monoamina en cuestión (Ungerstedt y col, 1.969) y por otros compuestos agonistas.

b) Los efectos del neurotransmisor pueden ser bloquea-

dos por diferentes clases de drogas psicoactivas (Carlsson y Lindquist, 1.963; Bunney y col, 1.973).

c) Los compuestos psicoactivos producen síndromes extrapiramidales.

La actividad de las drogas antisicóticas y las neurolepticas está relacionada con un bloqueo efectivo de los receptores en el SNC, lo cual produce deficiencia de DA en los ganglios basales, produciéndose síntomas semejantes a los de la enfermedad de Parkinson (Snyder y col, 1.974). Por ello muchas de las drogas antisicóticas producen síntomas extrapiramidales (EPS), como aquinesia, rigidez muscular y temblores, tanto en el hombre como en los animales de experimentación, excepto la tioridazina y la clozapina, que son potentes neurolepticos, pero muestran baja incidencia de EPS aún en dosis altas (Costall y col, 1.975) debido a sus propiedades anticolinérgicas centrales (Young y col. 1.972; Crowand y Gillble, 1.973).

Hay una diferenciación regional en el cerebro entre los receptores de DA responsables de los efectos antisicóticos y extrapiramidales. Los efectos antisicóticos estarían mediados por bloqueo de los receptores de DA en las neuronas dopaminérgicas del mesolímbico (Anden, 1.974; Bartholini, 1.976), mientras que los efectos extrapiramidales resultaban del bloqueo del receptor de DA en el sistema estriatal (Mattyse, 1.974). Estas conclusiones están apoyadas por estudios bioquímicos (Bower y Rozitis, 1.974; Anden, 1.974; Costall y Naylor, 1.974).

La interacción de los agonistas y antagonistas con los receptores centrales están acompañados por una variedad de consecuencias farmacológicas, bioquímicas y clínicas que podemos resumirlas en:

	<u>AGONISTAS</u>	<u>ANTAGONISTAS</u>
1) Farmacológicas	a) Estimulantes b) Eméticos	a) Depresivos b) Antieméticos
2) Bioquímicas	a) Decrece el "turnover" b) estimula la actividad de la adenilato ciclase. c) unión fuerte a los receptores específicos de las monoaminas	a) Aumenta el "turnover" b) Antagoniza los estímulos de la adenilato ciclase. c) unión fuerte a los lugares específicos del haloperidol.
3) Clínicas	Antidepresivos	Antisicóticos o Antiesquizofrénicos

Los agentes que actúan sobre los receptores centrales pueden ser agrupados como agonistas puros (DA, Dopa, apomorfina, fenilefrina, adrenalina), como mezcla de agonista/antagonista (ácido lisérgico y dietilamida) y como antagonistas puros (haloperidol), según la capacidad específica de unión.

Hay lugares de unión específica en los receptores para agonistas y antagonistas, habiendo una alta afinidad de las drogas antagonistas para los lugares de unión del haloperidol y de las drogas agonistas para los de DA o los de NA (Changeux, 1.966; Karlin, 1.967; Changeux y Podleski, 1.968; Snyder, 1.975). Este concepto de dos conformaciones distintas ha sido propuesto para otros receptores como los opiáceos (Pert, 1.975; Snyder, 1.975), glicina (Young y Snyder, 1.974) y receptores de serotonina en el tejido cerebral (Snyder y Bennet, 1.975).



### 3.2.1. Agonistas.

Los efectos de las monoaminas en muchos sistemas son imitados por drogas agonistas (Kebanian y col, 1.972; Horn y col, 1.974) y antagonizados por drogas neurolépticas (Kebanian, 1.972). Así, se observó que cuando se estimulaban los receptores de DA o NA con agonistas (apomorfina y clonidina respectivamente) se producía un incremento de la actividad motora (Ernst y Smelik, 1.966; Anden y col, 1.967).

La observación de que la L-Dopa podía compensar la deficiencia de DA en los ganglios basales en la enfermedad de Parkinson, llevó al desarrollo de agentes similares a la DA como drogas antiparkinsonianas (Pinder, 1.973, 1.974).

La apomorfina, agonista del receptor de DA, se observó que estimulaba el sistema dopaminérgico en el cuerpo estriado de la rata y del ratón (Ernst y Smelik, 1.966; Anden y col, 1.967; Lotti, 1.974) y producía, al igual que la DA, vasodilatación renal en el perro (Goldberg y col., 1.968). Es efectiva clínicamente en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Cotzias y col, 1.970; Daley y col, 1.971; Castaigne y col, 1.971; Cotzias, 1.972). Sin embargo su uso en la práctica clínica está limitado debido a su acción relativamente corta, a su gran actividad emética (Krantz y Carr, 1.969) y a sus propiedades colinérgicas (Duby y col, 1.972). Se han estudiado otros agentes antiparkinsonianos, como las benzoquinoleínas, de duración más larga y sin propiedades eméticas y colinérgicas. Se sintetizaron varios análogos de DA (Brogman y col, 1.973; Miller y col, 1.974; Ginos y col, 1.975; Canon y col, 1.975; Costall y col, 1.974), observándose que la sustitución en el carbono  $\alpha$  ( $\alpha$ -metil-Dopa) re-

ducía la actividad, que la hidroxilación en el carbono  $\beta$  (NA) abolía la actividad dopaminérgica y que cuando se reducía o se incrementaba la longitud de la cadena lateral se obtenían compuestos inactivos. Neumeyer y col (1.973, 1.974 1.976), Saari y col (1.974), Atkinson y col (1.975) y Ginos y col (1.975) sintetizaron y valoraron biológicamente varias apomorfinas, que actuaban como agentes dopaminérgicos centrales.

En el cerebro hay receptores adrenérgicos estimulantes y depresores, semejantes a los receptores periféricos (Leonard, 1.975). Los efectos centrales de las catecolaminas, tanto los depresores como los excitantes, pueden prevenirse por antagonistas de los receptores  $\alpha$ .

Como agonistas de las catecolaminas se han utilizado alcaloides relacionados con las aminas simpáticas, como la mescalina (trimetoxi-fenil etilamina) para provocar estados de excitación y trance. Tanto la efedrina como la metanfetamina (de acción  $\alpha$  y  $\beta$ ) pueden considerarse como simpaticomiméticos indirectos, pero no se puede excluir efectos directos sobre los receptores centrales y periféricos. Estas aminas son denominadas aminas despertadoras, aludiendo a uno de sus efectos farmacológicos, el antihipnótico. Facilitan la transmisión monosináptica y polisináptica de la médula espinal. Disminuyen el efecto depresor de los barbitúricos en la formación reticular, tanto en el hombre como en los animales. Estimulan el centro respiratorio deprimido por hipnóticos y anestésicos. En general, se observa una aceleración y desincronización del EEG. Correspondiente a estas acciones centrales, se producía en los animales manifestaciones de actividad motora aumentada, inquietud e insomnio. En el hombre, los efectos psíquicos son importantes, con disminución

de la sensación de fatiga, hiperactividad, euforia y aumento de la capacidad psíquica, pero al disminuir la acción aparece fácilmente depresión y fatiga. Un aspecto accesorio de la acción central de estas aminas simpáticas es su acción analgésica. Produce también anorexia. Los efectos de estos agonistas podríamos resumirlos en antihipnóticos, antidepresivos y anorexiantes.

### 3.2.2. Antagonistas

La primera evidencia de los efectos bioquímicos de los antagonistas dopaminérgicos en el cerebro fue presentada por Carlsson y Lindquist en 1.963. Más tarde Anden, Roos y Werdinius (1.964) demostraron que los niveles de ácido homovanílico y de ácido dihidroxifenil acético eran elevados. Igualmente se observó que el "turnover" de la NA y la formación de metabolitos (3-metoxi-4 hidroxifenil etilenglicol (MOPEG)) era acelerado por varias sustancias neurolépticas (Carlsson y Lindquist, 1.963; Keller y col, 1.973; Bartholini y col, 1.973; Berridge y Sharman, 1.974; Burki y col, 1.975; Hyttel y Sedwall, 1.975; McMillen y Shore, 1.978). Ader y Korf (1.979), Nyback (1.968) y Sedwall y col (1.975), utilizando tirosina marcada, demostraron que había un incremento, en los animales y en el hombre, del "turnover" de las catecolaminas cuando estos eran tratados con drogas antisicóticas. Este incremento del "turnover" parece ser debido a un incremento de la tasa de liberación que sigue como consecuencia de un reflejo al bloqueo del receptor ejercido por la droga antisicótica (Kumar y Jain, 1.977).

La inducción "in vitro" del AMP<sub>c</sub> por NA o DA en homogenizados de cerebro es inhibido por drogas antisicóticas (Palmer y col, 1.971,72; Uzunov y Weiss, 1.971; Kebanian y col.

1.972, Clement-Cormier y col, 1.974; Miller y col, 1.974; Horn y col, 1.974; Karobath y Leitich, 1.974; Palmer y Manian, 1.974; Blumberg y col, 1.975-76, Horn y Phillipson, 1.976). En la mayoría de los antisicóticos, hay una correlación entre los resultados "in vitro" e "in vivo" (Moller-Nielsen y col. 1.973) excepto con las butirofenonas (Krueger y col, 1.975; Iversen y col, 1.975), tales como el haloperidol, las cuales son efectivas en animales experimentales a dosis más bajas que la clorpromazina (Janssen, 1.965, Janssen y col, 1.966,67) pero "in vitro" estas son menos potentes que la clorpromazina (Miller y col, 1.974; Karobath y Leitich, 1.974). Esta actividad débil de las butirofenonas comparadas con las fenotiazinas, puede ser debida a diferencias de absorción, distribución y metabolismo de estas drogas "in vivo" (Kumar y Jain, 1.977). La mayoría de los neurolépticos son bloqueantes de los receptores centrales de las catecolaminas y su eficacia antisicótica parece ser debida al bloqueo de la neurotransmisión catecolaminérgica en el cerebro (Snyder, 1.975). El haloperidol es un potente bloqueador del receptor  $DA_2$ , mientras que la clozapina lo es del receptor  $DA_1$  (Miller, 1.974; Clement-Cormier y col, 1.974; Westerink y Korf, 1.975, Kebabian y Calne, 1.979). La clozapina actúa preferentemente en el sistema dopaminérgico límbico (Huff y Adams, 1.980). Ambos neurolépticos decrecen también los niveles endógenos de NA en el "locus coeruleus" (Ader y col, 1.980).

Químicamente muchos antagonistas de los receptores catecolaminérgicos pueden ser clasificados en los siguientes grupos:

- 1) Fenotiazinas y neurolépticos tricíclicos emparentados.
- 2) Benzo (6,7) ciclo hepta (1,2,3) pyrido (2,1,a)

#### Isoquinolinas

- 3) Butirofenonas, y difenil butil piperidinas.
- 4) Pirazinopiridoindoles.

Los fármacos que actúan como inhibidores del receptor DA también tienen utilidad terapéutica, ya que son usados en el tratamiento de la esquizofrenia. A menudo los pacientes psicóticos tratados con clorpromazina sufren una mejoría notable en sus síntomas mentales, pero los efectos secundarios del fármaco limitan su uso. Así, después de un tratamiento prolongado, puede ocurrir que los pacientes tengan movimientos anormales semejantes a los observados en la enfermedad de Parkinson. Por tanto parece que la clorpromazina lleva consigo la inducción farmacológica de la enfermedad de Parkinson por medio de un bloqueo de los receptores DA situados en los ganglios basales, imitando así los síntomas debidos al agotamiento de DA, aún cuando el neurotransmisor se halle presente en cantidades normales. (Kumar y Jain, 1.977).

#### 4. PROCESOS PATOLOGICOS QUE CURSAN CON ALTERACIONES DE LOS NIVELES DE DA Y NA.

A nivel neuronal pueden surgir trastornos cerebrales a consecuencia de procesos químicos anormales que ocurren en las sinapsis entre células nerviosas. Las alteraciones en la síntesis, liberación o inactivación de un transmisor químico determinado, así como las alteraciones en la sensibilidad de los receptores postsinápticos del transmisor, pueden originar una perturbación sináptica; disfunción ésta que no necesita estar acompañada de cambios morfológicos a ningún nivel, ni macroscópico ni microscópico.

Encontramos procesos patológicos en los cuales hay una disminución de los niveles de catecolaminas (Corea de Huntington y enfermedad de Parkinson) y otros que, en cambio, presentan una hiperactividad catecolaminérgica (esquizofrenia, espasmos infantiles, epilépticos y patologías tumorales: neuroblastoma, feocromocitoma).

El Corea de Huntington es una enfermedad hereditaria de tipo dominante que está caracterizada por contracciones desordenadas de varios grupos musculares y sin ningún tipo de control. En estos enfermos el peso del cerebro es menor, mientras que el del cerebelo es normal.

Esta afección produce una atrofia generalizada del cuerpo estriado y una degeneración de las neuronas del núcleo caudado, de otros núcleos nerviosos y de la corteza cerebral frontal (Kety, 1.979). El contenido de DA en el cuerpo estriado está considerablemente reducido, encontrándose también una disminución del número de receptores.

En la enfermedad de Parkinson hay una degeneración del tracto nigro-estriatal. La degeneración de estas fibras hace que se reduzca la cantidad de DA disponible; por lo tanto las células comienzan a no funcionar normalmente y se producen los síntomas característicos del Parkinson: a) aquinesia b) rigor. c) temblor en reposo (Codina, 1.970).

Tanto la catalepsia como el parkinsonismo pueden provocarse con neurolepticos. Estas drogas, además de acelerar el "turnover" de la DA, bloquean sus receptores. En este tipo de enfermedad los receptores de DA no están dañados, por lo que si se administra L-Dopa se formará DA que estimulará los receptores de DA en los ganglios basales, paliando así los síntomas de la enfermedad (Iversen, 1.980).

En la esquizofrenia se ha encontrado, en cambio, un aumento en el número de receptores de DA del tipo  $D_2$ . Parece ser que esta enfermedad se halla asociada a una hiperproducción de DA o bien a una hipersensibilidad al neurotransmisor en determinadas zonas cerebrales. En la autopsia de pacientes fallecidos en el transcurso de la enfermedad se ha observado un aumento en los niveles de DA y de sus receptores en el sistema límbico; esto podría explicar los trastornos de conducta que caracterizan a la enfermedad (Iversen, 1.980). Además se ha observado que las drogas antisicóticas tienen solamente efecto en el límbico (Anden y Stock, 1.973). La actividad de la DBH en cerebros de individuos esquizofrénicos es baja (Wise y Stein, 1.973,75). Todo ello confirma que la esquizofrenia es debida a una hiperactividad dopaminérgica, sobre todo en el límbico, encontrándose en cambio baja cantidad de NA.

También hay una elevada actividad del sistema dopaminérgico en individuos con espasmos infantiles (Ito y col, 1.980), convulsiones febriles (Habel y Yates, 1.981) y estados epilépticos. Ito y col (1.980) observaron que el incremento del metabolismo de DA era una consecuencia de las convulsiones.

Por último tenemos las patologías tumorales de las crestas neurales (neuroblastoma y feocromocitoma). Estos tumores sintetizan grandes cantidades de A, NA y a veces de DA. La excreción en orina de DA, A y NA en exceso nos indica generalmente la presencia de un neuroblastoma en niños (Knighth y Haymond, 1.977) y más raramente la de un feocromocitoma (Gitlow y col., 1.970). Los feocromocitomas son tumores originados en el sistema nervioso simpático, y se pueden formar en cualquier zona de este sistema, sobre todo en la médula adrenal, donde se localiza en el 80% de los casos. Los tu-

moreos formados en la médula adrenal segregan A y NA en proporción 4:1, mientras que los extradrenales segregan NA y DA. Tanto el feocromocitoma como el neuroblastoma tienen un origen embrionario común y ambos presentan un incremento en orina de los precursores y metabolitos de las catecolaminas. (Ross, 1.976; PatoCastel y col, 1.981).

## 5. CATECOLAMINAS Y SISTEMA ENDOCRINO.

Las neuronas catecolaminérgicas cuyos axones terminan en la eminencia media (EM) están involucradas en la regulación de la adenohipófisis a través de la circulación portal que conecta el hipotálamo con la hipófisis. Hay multitud de conexiones del hipotálamo con el resto del SNC. Recibe entradas procedentes del sistema límbico (que incluye el hipocampo, la amígdala y las áreas septales), de la corteza, del tálamo, del sistema reticular activante y de los tractos autonómicos ascendentes, vía médula espinal. Es decir, que está potencialmente conectado con todas o casi todas las partes del cerebro. Todas estas entradas nerviosas que llegan al hipotálamo pueden activar células neurosecretoras haciendo que segreguen neurohormonas reguladoras de la secreción adenohipofisaria (Krieger, 1.980).

Por medio de estudios histoquímicos de fluorescencia se ha podido observar la distribución de los terminales nerviosos catecolaminérgicos en la EM, observándose que la capa subependimal contiene principalmente terminales nerviosos de NA, mientras que la zona lateral en empalizada contiene terminales dopaminérgicos, y en la zona medial en empalizada existen ambos terminales nerviosos noradrenérgicos y dopaminérgicos (Björklund, Moore y col, 1.973; Jonsson y col.



1.972; Lofstrom, A., 1.977).

El "turnover" de las catecolaminas (CA) en estas áreas discretas de la EM, puede ser alterado por cambios en el estado endocrino. Así se han observado cambios significativos en el turnover de las CA durante la preñez y el ciclo estral en la capa subependimal (SL) y en la zona lateral en empalizada (LPZ) (Lofstrom, Eneroth y col., 1.977), o en la zona lateral en empalizada (Wiesel y col., 1.978) después del tratamiento con estrógenos, y en la zona lateral en empalizada y en la zona medial en empalizada después del tratamiento con prolactina (Wiesel y col., 1.978).

Los estudios bioquímicos han indicado que la actividad de la tirosina hidroxilasa en la EM, enzima limitante de la síntesis de las catecolaminas, podía ser alterada por varias manipulaciones del sistema endocrino (Kizer y col., 1.978; Kizer, 1.976; Kizer, 1.974; Nakahara y col., 1.976, 1.979).

Alrededor de la región de la EM también se encuentran los somas de muchas neuronas peptidérgicas que producen hormonas hipotalámicas. Sus axones se extienden en la capa externa de la EM, los cuales se anastosoman con el sistema vascular que transporta los factores liberadores o inhibidores a la hipófisis.

Esta relación anatómica nos puede sugerir varias formas mediante las cuales los neurotransmisores regulan la secreción hormonal hipotalámica de los RF o IF que regulan la secreción hipofisaria de ACTH, FSH, LH, GH, TSH y MSH. Una posibilidad sería la comunicación célula-célula, en la que el transmisor liberado por el terminal nervioso de una célula actuaría en el receptor de una segunda célula. Un transmisor puede actuar también sobre las células que producen hormonas peptidérgicas, a mayor distancia, a través de múltiples si-

napsis, o bien los neurotransmisores pueden ser secretados directamente en los vasos portales, produciendo la secreción hipotalámica de hormonas o de sus inhibidores, modificándose la acción hormonal hipotalámica a nivel de la hipófisis (Frohman, 1.980).

El cerebro se puede considerar como órgano diana de las hormonas finales. Los efectos que ejercen sobre él, podemos agruparlos en cinco categorías (Mc Ewen, 1.980):

1) Efectos feedback positivo y negativo en el hipotálamo y en la hipófisis respecto a la secreción de hormonas.

2) Control de patrones específicos de comportamiento instintivo. p. ej. el comportamiento sexual.

3) Efecto de inducción y organización, especialmente los efectos de las hormonas gonadales en la diferenciación sexual.

4) En el comportamiento adaptativo.

5) Efectos metabólicos generales, como los efectos cerebrales de la hipoglucemia inducida por insulina..

Algunos de estos efectos hormonales ocurren únicamente en la vida adulta; otros ocurren desde el principio del desarrollo y su influencia neuroendocrina se prolonga a lo largo de toda la vida del organismo.

Las hormonas liberadas pueden tener influencia en el metabolismo del neurotransmisor, bien alterando la concentración del neurotransmisor disponible y, de este modo, modifican do la actividad eléctrica de las células neurosecretoras, ó bien alterando la sensibilidad de la célula postsináptica al neurotransmisor (Frohman, 1.980).

### 5.1. GLANDULAS ADRENALES

Las glándulas adrenales o suprarrenales están situadas sobre el polo superior de ambos riñones. Constan de una zona central, -médula adrenal- derivada de la cresta neural ectodérmica, que elabora hormonas nitrogenadas (catecolaminas), envuelta por una zona periférica -corteza suprarrenal-, desarrollada a partir del epitelio celómico, que sintetiza hormonas esteroideas.

El crecimiento de las suprarrenales fetales obedece al estímulo de la ACTH de la hipófisis fetal y no de la materna.

Las suprarrenales fetales forman predominantemente los esteroides anabolizantes necesarios para el crecimiento del feto.

Estos dos tejidos, de diverso origen embrionario, están relacionados entre sí: así, ambos reciben un riego sanguíneo a través del cual los productos metabólicos de la corteza bañan profusamente la médula, mediante la vasta red venosa del sistema portal intradrenal.

La secreción de glucocorticoides es controlada casi totalmente por la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) secretada por la hipófisis anterior; esta hormona también estimula la producción de andrógenos suprarrenales por la corteza.

La secreción de ACTH por la adenohipófisis, está regulada principalmente por mecanismos nerviosos y por la retroalimentación ejercida por los factores humorales presentes en la sangre.

El mecanismo neuroendocrino responde a una amplia variedad de estímulos diferentes. Cualquier tipo de "stress" modifica la secreción de acetilcolina de las fibras coliné-

gicas de la zona perifornical del hipotálamo, que llegan a los núcleos ventrales hipotalámicos. Las neuronas secretoras de estos núcleos segregan el factor liberador de corticotropina (CRF) al interior del plexo capilar del sistema portal hipofisario.

Además existe una regulación sobre la actividad del mecanismo hipotálamo-hipofisario por las concentraciones sanguíneas de glucocorticoides. Los glucocorticoides tienen efectos directos de retroalimentación negativa sobre la hipófisis anterior (disminuyendo la formación de ACTH), sobre el hipotálamo (para disminuir la formación de CRF) y también se ha visto que actúan sobre distintas áreas cerebrales.

Se han hecho numerosas investigaciones acerca de las áreas del cerebro que están implicadas en el efecto feedback de los glucocorticoides.

Recientemente Feldman y Conforti (1980) estudiaron el efecto que tiene la dexametasona en las respuestas adrenocorticales al stress inducido por éter, tanto en ratas intactas, como en ratas con lesiones cerebrales, descubriendo el papel de las estructuras límbicas en la regulación por retroalimentación negativa de la función adrenocortical.

Estos autores indicaron que en el efecto feedback de los glucocorticoides están implicadas áreas específicas, ya que lesiones en el área preóptica del hipotálamo y en el septum no jugaban ningún papel en el feedback de la dexametazona. Además pusieron de manifiesto la existencia de unos mecanismos extrahipotalámicos inhibidores y activadores que alteraban la sensibilidad del hipotálamo al control por los glucocorticoides.

La concentración plasmática de éstos muestra un ritmo circadiano. Los niveles secretorios de CRF, ACTH y glucocor-

ticoides son altos al comienzo de la mañana y bajos al final de la tarde. Esto es debido a señales procedentes del hipotálamo que provocan la secreción de glucocorticoides.

El eje hipófisis-adrenal comienza a funcionar antes del nacimiento; el día 16º de gestación ya hay actividad adrenocorticotrópica por parte de la hipófisis fetal. Hary (1.981) observó que el mecanismo de retroalimentación negativa que ejercen los esteroides adrenales sobre el eje hipotálamo-hipófisis opera a partir del día octavo postnatal.

La médula adrenal, que surge embriológicamente de las crestas neurales, permanece como parte funcional del sistema nervioso. De hecho, se puede pensar en ella incluso como un ganglio simpático especializado, que es innervado por la típica neurona preganglionar. Hay sinapsis colinérgicas en la glándula con las células cromafines, que al ser activadas descargan A y NA directamente a la sangre.

Wurtman (1.966) demostró la existencia de una base bioquímica para la relación funcional entre la médula y la corteza. Mostró que la actividad de la fenil etanolamina N-metil transferasa (PNMT) dentro de la médula adrenal de los mamíferos está regulada por los glucocorticoides producidos en la corteza.

Este autor encontró que las células cromafines de la médula constituyen un órgano diana para los glucocorticoides. Factores como la insuficiencia hipofisaria, que alteran la síntesis o secreción de los glucocorticoides, pueden ocasionar cambios en la disponibilidad de adrenalina.

En las ratas hipofisectomizadas "estresadas" se ha observado una disminución de PNMT en la médula adrenal, que puede ser prevenida o corregida por tratamiento con ACTH o glucocorticoides (Wurtman, 1.966; Axelrod, 1.972).

La disminución de los niveles de DBH en estos animales es también prevenida con ACTH o con dexametasona. En cambio, los niveles de tirosina hidroxilasa son aumentados por la ACTH pero no con la dexametasona. Parece ser que la ACTH tiene un efecto sobre la síntesis adrenal de la tirosina hidroxilasa (Carballeira y Fishman, 1.980) que no está mediada por los corticosteroides.

La ACTH aparentemente afecta a las enzimas medulares adrenales de dos formas: actúa directamente sobre la médula para estimular la formación de AMP cíclico, y éste a su vez actúa como un segundo mensajero para aumentar la producción de TH y DBH (Kopin, 1.980).

La ACTH también aumenta el AMPc en la corteza adrenal y, por lo tanto, eleva la producción de corticosteroides. Los corticosteroides a su vez aumentan los niveles de PNMT y DBH, de forma que estas enzimas están también bajo el control indirecto de la ACTH. Parece ser que los niveles de PNMT están controlados fundamentalmente por el sistema hipófisis-adrenal, y sólo en una pequeña proporción lo está por influencias neuronales, a diferencia de la DBH, cuyos niveles están influenciados por impulsos nerviosos y por el sistema hipofiso-adrenal, mientras que los niveles de TH están controlados fundamentalmente por el S.N. y sólo ligeramente por las hormonas adrenocorticales (Carballeira y Fishman, 1.980).

Los sensores para los diversos tipos de "stress" no están bien definidos anatómicamente, pero las rutas en el SNC parecen implicar a las catecolaminas, así como a otros neurotransmisores. Así se ha visto que el nivel de catecolaminas en el núcleo arqueado está disminuido en animales sujetos al "stress" de inmovilización, a la inyección de formalina y a la exposición al frío, mientras que el nivel de catecolaminas

en otros núcleos del hipotálamo, en la corteza cerebral y en el núcleo caudado parece ser que no varía. La disminución de los niveles de catecolaminas que se ha visto en el núcleo arqueado refleja presumiblemente un incremento de la liberación de neurotransmisores (Kopin, 1.980).

Las catecolaminas liberadas de la médula adrenal y de los nervios simpáticos durante el "stress" intervienen en las conocidas respuestas metabólicas y fisiológicas, como la hipoglucemia, la taquicardia, la elevación de la presión sanguínea, etc. El papel de las catecolaminas periféricas en el desencadenamiento de la respuesta por la corteza adrenal no está bien definido. La medulectomía adrenal no altera la respuesta corticoadrenal al "stress", y se ha visto que la adrenalina no es esencial para la producción de esteroides.

Aunque las catecolaminas liberadas en la sangre generalmente no pasan al cerebro, sí penetran en ciertas regiones, como el área postrema del hipotálamo, donde parece haber una deficiencia de la barrera hematoencefálica. Aquí podrían jugar un papel importante en la regulación de las tasas de liberación de los factores que controlan la descarga de las hormonas hipofisarias (Kopin, 1.980).

#### 5.1.1. Monoaminas en el control de las funciones hipofisosuprarrenales.

La participación de los neurotransmisores en el control cerebral de las funciones hipofisosuprarrenales puede estar condicionada por las características especiales en que opera este sistema, ya que el cerebro controla la secreción adrenocortical de tres maneras: (Wurtman, 1.971)

1) Secreción de reposo: el cerebro participa en un sistema de feedback negativo, manteniendo los niveles de corti-

coides plasmáticos dentro de unos límites homeostáticos.

2) Ritmo circadiano: el cerebro interviene en los mecanismos mediante los cuales se producen variaciones homeostáticas en función del tiempo. Hay, por tanto, un ritmo en la secreción adrenocortical.

3) Situación de "stress" (Ganong, 1.967): el cerebro actúa aumentando la secreción adrenocortical.

Los transmisores son capaces de alterar solamente algunos de estos mecanismos, mientras que en los demás su participación sería de naturaleza permisiva o condicionante.

En condiciones basales o de reposo se ha comprobado que la NA, la DA y el carbacol (colinérgico) activan la secreción de ACTH (Endröczy y col., 1.963; Krieger y col., 1.964; Hall y Marks, 1.970). Estos efectos se han obtenido con elevadas concentraciones, inyectadas por vía intraventricular, habiéndose descartado la posibilidad de una acción periférica o refleja que involucre mecanismos periféricos. El hecho de que tanto los transmisores colinérgicos como los monoaminérgicos estimulen en igual sentido la corteza suprarrenal hace pensar que estos compuestos actúan en el cerebro inespecíficamente y, por las altas dosis administradas, se comportan como falsos neurotransmisores, ya sea mimetizando o alterando la función de algunos de los sistemas involucrados (O. Donoso, 1.975).

Marks y col. (1.970) estudiaron el papel de las monoaminas en la regulación de los mecanismos neuroendocrinos de la secreción de ACTH, alterando el contenido o la actividad biológica de las catecolaminas endógenas. Observó que la deplección de las aminas, bien por tratamiento con reserpina o con antagonistas, como clorpromazina, causaba primero una intensa activación de la secreción de ACTH y, después de un período



de latencia, había un bloqueo posterior de la liberación de ACTH, debido a que tanto la reserpina como la clorpromazina causaban una disminución acusada del CRF en el hipotálamo; esta acción era ejercida a nivel cerebral, siendo inactivos los compuestos inyectados periféricamente, ya que no atravesaban la barrera hematoencefálica.

A favor de esta acción inhibitoria de las catecolaminas están también los experimentos de Steiner y col. (1.969), los cuales, mediante registro de la actividad eléctrica espontánea, detectaron la sensibilidad de las neuronas hipotálamicas vinculadas probablemente a la función adrenocorticotrófica frente a los diversos neurotransmisores. En la sustancia gris periventricular del 3º ventrículo, se encuentran, en forma dispersa, neuronas sensibles a la dexametasona; este compuesto, administrado por microelectroforesis, inhibe la actividad de dichas neuronas, las cuales son también sensibles a la NA y a la DA, que las inhiben, y a la acetilcolina, que las estimula (Steiner y col., 1.969; Steiner y col, 1.968).

Es interesante destacar que la DA produce efectos inhibitorios más intensos que los de la NA y que su acción es instantánea. La ACTH actúa de una forma bifásica sobre tales neuronas, excitándolas al principio y luego inhibiéndolas. Es posible que las neuronas analizadas correspondan a las que sintetizan CRF. Si es así, los neurotransmisores modularían, de manera directa sobre el cuerpo neuronal o a través de sinapsis axodendríticas, la secreción de esta hormona hipotálamica (O. Donoso, 1.975).

Por lo tanto, la deplección o la neutralización de las catecolaminas por medio de antagonistas produciría una secreción incontrolada de CRF en el sistema, agotándose el CRF almacenado.

Hay otra serie de evidencias a favor de la hipótesis

de que las catecolaminas hipotalámicas inhiben la secreción de CRF, como son:

a) Administrando drogas que, como las anfetaminas, producen un incremento de la liberación neuronal de catecolaminas, disminuye la secreción de ACTH inducida por el stress.

b) El pretratamiento con pargilina previene los efectos de la reserpina en cuanto a la liberación de ACTH y a la deplección del CRF (Bhattacharya y Marcks, 1.969).

c) La administración intraventricular de pequeñas dosis de NA en ratas inhibe rápidamente la hipersecreción de ACTH producida por el pretratamiento con reserpina (Marks y col., 1.970).

Se han realizado numerosos estudios para comprobar la influencia de los corticoides adrenales sobre el contenido cerebral de catecolaminas, encontrándose resultados distintos.

Si los corticoides eran administrados durante la preñez (días 12-17 de la gestación) no había ninguna alteración en los niveles de DA y NA durante el desarrollo postnatal; no era afectado, por tanto, el patrón de desarrollo celular (Van Geijn y col., 1.979). Ulrich y col (1.975) implantaron corticoides en el hipotálamo de rata, observando una elevación de los niveles de 5HT pero no de NA; pero si se determinaban los niveles de NA a los 30 días en las ratas tratadas neonatalmente, había un incremento con respecto a los controles, no sufriendo en cambio variaciones la DA.

Esto está en contradicción con lo encontrado por Labovitz y Thuret dos años después, los cuales, después de inyectar hidrocortisona dos horas antes del sacrificio, observaron una disminución de la tirosina plasmática y un descenso muy importante de DA y NA.

Más tarde, Lengvari y col (1.980), tratando neonatal-

mente a los animales con corticosterona, encontraron una disminución de los niveles de NA y de DA en el hipotálamo, y de la NA mesencefálica y una elevación de la DA mesencefálica durante los días 16-21 de edad.

Además, los glucorticoides pueden alterar las actividades de determinadas enzimas, como la MAO. Así se observó que los glucocorticoides tienen un ligero efecto inhibitorio sobre la MAO cerebral (Veals y col., 1.977).

La variación diaria o circadiana de la secreción de ACTH y de corticoides se puede bloquear con anticolinérgicos, como la atropina (Krieger y col., 1.968), lo cual indica que en este mecanismo están implicadas sinapsis de naturaleza colinérgica. Aunque se observó también que las sustancias que alteran los niveles normales de 5HT en cualquier sentido bloquean asimismo la variación circadiana (Krieger y Rizzo, 1.969). Por lo tanto también es necesaria la existencia de un nivel metabólico normal de la 5HT.

Las catecolaminas parece ser que no influyen en el ritmo circadiano, ya que si se bloquean los receptores adrenérgicos, el ritmo no se altera; tampoco desaparece el ritmo de secreción del CRF después de la deplección de las catecolaminas.

En situaciones de "stress" prolongado, que ocasiona una intensa descarga de corticosteroides y de ACTH, aumenta la liberación de NA, disminuyendo los niveles cerebrales de ésta; pero no así los de la DA. Ello puede ser debido a que en estas condiciones los mecanismos de resíntesis de la NA no sean suficientes para mantener dichos niveles, pero sí lo sean los de la DA (Bliss y col., 1.968).

Durante el "stress" hay aumento del turnover de las monoaminas 5HT, DA y NA en el cerebro (Corrodi y col., 1.968;

Bliss, 1.968; Iversen y Simmonds, 1.969; Glowinski e Iversen, 1.966; Curzon y Green, 1.971); pero si el stress es breve no se detectan cambios.

#### 5.1.2. Adrenalectomía.

La adrenalectomía bilateral ocasiona los siguientes fenómenos:

- a) Pérdida de sodio por la orina, disminución del volumen hemático, aumento del hematocrito, descenso del flujo plasmático renal y disminución de la filtración glomerular.
- b) Tendencia a la hipoglucemia, con aumento de la sensibilidad a la insulina.
- c) Menor resistencia a las infecciones.
- d) Deficiente excreción de agua y menor recambio de sodio en el riñón.
- e) Defectuosa movilización y utilización de las grasas.

La adrenalectomía produce además una disminución del peso corporal de los animales.

Numerosas investigaciones han mostrado que la adrenalectomía bilateral de la rata macho adulta hace disminuir los niveles de corticosterona en sangre (Dallman y col., 1.972; Buckingham y col., 1.974; Desserwiest, 1.976) e incrementa la concentración de ACTH (Dallman y col, 1.972; Buckingham y Hodges, 1.974; Ulrich y Slusher, 1.964; Matsuyana y Minus, 1.971). Por el contrario, muy pocas observaciones se han llevado a cabo en ratas hembras adultas, en las cuales tambien se ha descrito un descenso de corticosterona en plasma, y un incremento de la concentración de ACTH a causa de la adrenalectomía (Mims, 1.973). Este autor encuentra que, en las ra-

tas adrenalectomizadas y sometidas a stress, se produce una elevación inmediata y sostenida de ACTH a los pocos minutos, que persiste varias semanas. El nivel de ACTH plasmático se duplica a los tres días de la adrenalectomía y se estabiliza hacia la sexta semana.

En las ratas adrenalectomizadas pero no sometidas a stress, las concentraciones plasmáticas de ACTH son bajas y no detectables durante las primeras 24 horas después de la operación, pero aumentan después de una forma gradual; estas concentraciones plasmáticas de ACTH nunca alcanzan los valores de las ratas adrenalectomizadas y sometidas a stress o a los de las ratas controles sometidas a stress.

Estos resultados indican que la rata puede responder al stress inmediatamente después de la adrenalectomía, si la intensidad del stress es suficiente.

Hay resultados conflictivos sobre el efecto de la adrenalectomía en las catecolaminas cerebrales: así, para Pfeifer y col. (1.963) y De Schaepe-dryver y col. (1.969) la suprarrenalectomía en la rata no influye sobre los niveles de NA en el hipotálamo y en el cerebro total.

Más tarde, Shen y Ganong (1.976) estudiaron el efecto de la adrenalectomía sobre la actividad DBH, sobre el contenido de catecolaminas y sobre la síntesis y metabolismo de la NA en el hipotálamo y en otras partes del cerebro, en ratas macho. Observaron que dos días después de la adrenalectomía disminuía la actividad DBH en el hipotálamo y en el tallo cerebral, pero no había cambios en el contenido de NA y DA. Administrando intraventricularmente DA tritiada, se vió que el paso de ésta a NA tritiada aumentaba ligeramente y la NA era metabolizada más rápidamente que lo normal.

El hecho de que la formación y el metabolismo fueran

aumentados, al mismo tiempo que la actividad DBH "in vitro" disminuía, hizo pensar que la DBH no era limitante en las neuronas adrenérgicas en el hipotálamo, o bien que las variaciones de actividad "in vitro" de esta enzima no están acompañadas por un cambio paralelo en su actividad "in vivo". Estos autores administraron, después de dos días de la adrenalectomía, una dosis grande de corticosterona y observaron que se producía un incremento de la DBH hipotalámica. Sin embargo, pequeñas dosis del esteroide, que producían una concentración plasmática comparable a la producida por la secreción endógena, no tenían este efecto. Este hecho demostraba la influencia de las glándulas adrenales en la actividad DBH cerebral, pero es todavía incierto si dicho efecto está mediado por los glucocorticoides.

Más tarde Rastogi y Singhal (1.977, 1.978) observaron que la adrenalectomía bilateral incrementaba la actividad tirosina-hidroxilasa en el núcleo estriado de la rata; en cambio la catecol-metil-transferasa no cambiaba, pero la actividad de la MAO en la corteza aumentaba significativamente siete días después de la operación. Quince días después de la adrenalectomía la concentración de NA disminuía significativamente en el hipotálamo y en el estriado, así como la DA en el tallo cerebral y en el estriado.

La administración de corticosterona anulaba los efectos observados. Estos datos sugieren que los cambios de los niveles de la NA y DA en el cerebro de ratas adrenalectomizadas son debidos específicamente a los esteroides adrenocorticales, los cuales juegan un papel en la regulación de la formación de las catecolaminas.

## 5.2. TIROIDES

Esta glándula está formada por un gran número de folículos llenos de una sustancia coloide y revestidos por células epitelioideas cuboides que segregan hacia el interior de los mismos. Cuando la secreción se encuentra en los folículos debe ser reabsorbida a través del epitelio folicular hasta la sangre para poder actuar en el cuerpo.

Las dos hormonas tiroideas más importantes son la tiroxina y la triyodotironina. La tiroxina regula la velocidad del metabolismo, influyendo sobre diversos procesos intracelulares.

Para conservar un metabolismo basal normal, debe segregarse la cantidad exactamente necesaria de hormona tiroidea; para ello hay un mecanismo de retroalimentación negativa, en el que intervienen el hipotálamo y la hipófisis anterior, para controlar la secreción tiroidea según las necesidades del organismo.

La función tirotrópica, además de ser regulada a nivel hipotalámico (Reichlin, 1.967), lo es en su mayor parte a nivel hipofisario.

En diversas áreas hipotalámicas, en la parte externa de la EM y en los núcleos dorsomedial, ventromedial y periventricular, se han identificado terminaciones nerviosas que contienen TRH.

La TRH, una vez liberada por las terminaciones nerviosas a los vasos del sistema portahipofisario, alcanza las células tirotropas hipofisarias sobre las que actúa, estimulando en ellas la síntesis y liberación de TSH. Además de estimular la TSH, la TRH estimula, en condiciones normales,

la secreción de PRL por las células lactotropas de la hipófisis, tanto en animales (Tashjian y col., 1.971; Mueller y col. 1.973) como en el hombre (Jacobs y col., 1.971; Bowers y col, 1.971).

La TSH, además de ser estimulada por la TRH, puede también responder a las deficiencias de hormona tiroidea, a largo plazo.

#### 5.2.1. Catecolaminas en el control de las funciones tiroideas.

Las catecolaminas actúan a nivel del SNC y a nivel de la hipófisis, regulando la secreción de TRH y TSH respectivamente.

La posibilidad de que las catecolaminas actúen a nivel de la hipófisis está apoyada por la observación de que el pretratamiento con L-Dopa en individuos normales o hipotiroideos, disminuye la respuesta de la TSH a la administración de la TRH. (Frohman, 1.980).

Se ha visto que ni la L-Dopa ni la DA tienen efecto sobre la secreción basal de TSH en individuos normales, pero sí en pacientes con hipotiroidismo primario y elevados niveles de TSH. (Frohman, 1.980). La administración de L-Dopa ó DA producía una caída de TSH.

La secreción de TRH está regulada por un doble sistema monoaminérgico, del cual las catecolaminas son las estimuladoras y la serotonina la inhibidora (Grimm y Reichlin, 1.973). Las neuronas colinérgicas están también involucradas en la regulación endocrina de la TRH, estimulando la liberación de esta hormona (Kojima y col., 1.981). Los niveles de TRH en el hipotálamo varían directamente con la función tiroidea, no



inversamente como era de esperar por el "feedback" negativo tiroides-hipófisis (Bassiri y Utiger, 1.974; Jackson y col., 1.974); éste regula la actividad de la enzima dopamina-~~phid~~roxilasa en las neuronas noradrenérgicas del tallo cerebral, teniendo un efecto inhibitorio directo sobre la actividad de la enzima cuando se administra agudamente (Stolk y Nisula, 1.975).

La tiroxina influye sobre la concentración de las catecolaminas en el cerebro. Se observó que, en ratas tratadas crónicamente con la hormona (durante tres semanas) disminuía la concentración de DA en la EM (Brown, 1.975), en el hipotálamo anterior y en el área preóptica (Sidneva y Adamskaia, 1.975). En el cerebro entero de rata, la síntesis de NA y de DA disminuye después del tratamiento con esta hormona (Prange y col., 1.970).

#### - 5.2.2. Hipotiroidismo y Tiroidectomía.

La hipófisis de los animales hipotiroideos muestra un mayor número de células basófilas (encargadas de sintetizar y segregar TSH) al tiempo que disminuyen las acidófilas.

La tiroidectomía no produce incremento en la concentración de TRH en el cerebro, sino que decrece significativamente (Bassiri y Utiger, 1.974; Jackson y col., 1.974). La disminución de hormonas tiroideas provoca una profunda alteración en los niveles periféricos de hormonas trópicas. Los niveles de TSH se encuentran aumentados (D'Angelo, 1.969) mientras que los de GH, ACTH y gonadotropinas (Suzuki y col. 1.970; Matsuzaki, 1.970) están disminuídos en animales tiroidectomizados después de la lactancia (Monrreale y col., 1.970), efectos que revierten a la normalidad o no aparecen si se administran hormonas tiroideas. De todo ello resulta

una atrofia o disminución funcional de todas las glándulas dependientes de estas hormonas. La corteza suprarrenal no se diferencia o presenta un tamaño menor que el normal y disminuye la biosíntesis y secreción de sus hormonas (Gaunt y col., 1.970). En la misma situación, las gónadas no se desarrollan y no aparece la diferenciación sexual.

La serie de alteraciones producidas por el hipotiroidismo a nivel hipofisario y de otras glándulas viene acompañado de trastornos metabólicos de lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y proteínas; disminuyen los procesos oxidativos y se favorece la acumulación de grasas con detrimento del contenido proteico. Disminuye, e incluso se detiene, el crecimiento corporal, se retrasa la maduración ósea y aparecen alteraciones del sistema nervioso.

El desarrollo del SNC en los vertebrados depende de la síntesis de hormonas tiroideas en cantidades adecuadas. Varios tipos de anormalidades neurales han sido descritos en animales hipotiroideos en su nacimiento o en las primeras fases de su desarrollo. Así, las ratas tiroidectomizadas al nacer son torpes, no responden a estímulos externos, no muestran interés por los acontecimientos ambientales y pueden considerarse mentalmente retrasadas. El peso del cerebro en tales animales es reducido y algunas neuronas son pequeñas y forman un todo compacto (Balazs y col., 1.968, 1.971; Pesetsky, 1.973).

Las hormonas tiroideas influyen también en el desarrollo de la corteza visual, de la auditiva (Gragg, 1.970), de la sensitiva, de la motora y del cerebelo (Geloso y col., 1.968).

Por lo tanto, la tiroidectomía neonatal produce cambios neuroquímicos intensos durante el desarrollo del cerebro, que están asociados con una actividad funcional altera-

da y pueden estar relacionados con un desequilibrio de las sustancias neurotransmisoras. Hay una reducción de la actividad tirosina-hidroxilasa y de la triptófano-hidroxilasa, enzimas limitantes de la síntesis de catecolaminas y de 5HT, en los cerebros de las ratas tiroidectomizadas, así como una reducción significativa de los niveles de NA, DA y 5HT (Hrdina y col., 1.975; Rastogi y col., 1.974, 1.976, 1.979).

La restauración de los niveles normales de las aminos cerebrales y de sus enzimas sintetizantes por el tratamiento con  $T_3$  a las ratas tiroidectomizadas indican que los cambios observados en el metabolismo neuronal son específicos de la hormona del tiroides (Rastogi y Singhal, 1.974). Stolk y Nissula (1.975) observaron, en ratas radiotiroidectomizadas, un incremento de NA y DA en el puente, en el bulbo y en el cerebelo, así como un incremento de la actividad "in vitro" de la tirosina-hidroxilasa en los ganglios basales, mientras que disminuía la actividad DBH en el puente y en el bulbo.

Más tarde, Nakahara y col (1.979) encontraron también un incremento de la actividad de la tirosina hidroxilasa en la zona medial en empalizada de la EM.

Los cambios de comportamiento observados en los animales tiroidectomizados pueden estar relacionados con la inhibición de la formación de la NA cerebral. Sin embargo, no está claro que el comportamiento aberrante y la depresión (Whybrow y col., 1.969) que se produce durante el estado cretinoide (debido a la tiroidectomía) esté relacionado con la disminución de una amina específica cerebral. Es más probable que el cretinismo esté relacionado con niveles subnormales de ambas catecolaminas y de indolamina (Coppen, 1.967; Schild-Kraut, 1.965).

La tiroidectomía química en ratas neonatales suprime

la actividad locomotora espontánea. Este dato apoya también el punto de vista de que la hormona tiroidea en la vida neonatal tiene un importante efecto regulador sobre el metabolismo de la NA, DA y 5HT y que la hipoactividad observada en estos animales puede ser debida en parte a defectos en la maduración de los sistemas sintetizantes de NA y DA en el cerebro de las ratas cretinas (Rastogi, 1.976).

### 5.3. GONADOTROPINAS

Hay tres patrones de secreción de gonadotropinas:  
(Grumbach, 1.980)

a) Episódico o pulsátil. En el macho y en la hembra adultos normales, la secreción de FSH y LH es episódica, con una frecuencia aproximada de un pulso cada dos horas.

b) Tónico o basal. La secreción tónica de gonadotropinas es consecuencia del efecto "feedback" negativo hipotalámico-hipofisario ejercido por los esteroides sexuales. Este tipo de secreción está presente tanto en machos como en hembras a todas las edades.

c) Cíclico. La secreción cíclica de gonadotropinas se presenta sólo en hembras a partir del comienzo de la vida fecunda, hasta que dejan de serlo. (Butcher y col, 1.971; Gay y col., 1.970). El patrón cíclico es la expresión de un efecto "feedback" positivo por el cual se incrementan los estrógenos en circulación hasta un nivel crítico de magnitud suficiente como para iniciar una fase preovulatoria en la que aparece la hormona luteinizante (LH). Los estrógenos actúan en la glándula hipofisaria aumentando su sensibilidad a la GnRH y muy probablemente, en el hipotálamo, aumentando la secreción de la GnRH.

El desarrollo del "feedback" positivo de la secreción de gonadotropinas por los esteroides sexuales es un requisito indispensable para la existencia del ciclo. Parece ser un último fenómeno de la maduración sexual en las hembras.

El control de la secreción cíclica de gonadotropinas parece residir en el área preóptica del hipotálamo (Gorski, 1.980).

#### 5.3.1. Catecolaminas en el control de la secreción de gonadotropinas.

Experimentos inmunocitoquímicos demuestran que la producción de LHRH está localizada en el área hipotalámica preóptica anterior (Barry y col., 1.973; Weindl y Sofroniew, 1.978), encontrándose altas concentraciones de LHRH en la eminencia media, en el núcleo arqueado y en el área preóptica (Baker y col., 1.975; Setalo y Flerko, 1.978; Sternberg y Hoffman, 1.978).

En el hipotálamo de rata hay vías dopaminérgicas y noradrenérgicas que afectan a las neuronas peptidérgicas que contienen los factores de liberación o de inhibición hipotalámicos. Así se ha visto que la DA y las neuronas que liberan GnRH están en la misma área: la capa lateral externa de la eminencia media (Barry y col., 1.973; Weindl y Sofroniew, 1.978); mientras que los terminales nerviosos noradrenérgicos se encuentran en la capa subependimal y algunos alcanzan la capa externa de la eminencia media.

La inervación noradrenérgica del área media preóptica y del hipotálamo medio basal procede de las fibras ascendentes de las neuronas noradrenérgicas mesencefálicas (Fuxe y col., 1.965, 1.966), mientras que gran parte de la inervación

preóptica dopaminérgica deriva del sistema incertohipotalámico (Björklund y col, 1.975), y la del hipotálamo medio basal incluyendo la EM es debida a neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (Fuxe y Hökfelt, 1.966; Weiner y col., 1.971).

Estas evidencias morfológicas de la interacción entre los terminales nerviosos de DA y NA con los de GnRH en la región arqueada-eminencia media está complementada con el hecho de que los cambios que experimentan las aminas biógenas son coincidentes con los flujos de LH y FSH.

Hay relación entre las fluctuaciones de las catecolaminas a lo largo de la vida y los niveles de PRL y de gonadotropinas en el suero (Höhn y Wuttke, 1.979). A los 15 días de edad las catecolaminas hipotalámicas se encuentran en concentraciones bajas, incrementándose progresivamente hasta los valores adultos; en esa edad (15 días) se observó que los niveles de FSH eran altos y los de PRL bajos. A medida que incrementan las concentraciones de DA y de NA, los niveles de PRL también subían, mientras que los niveles de LH bajaban; los niveles de FSH entre los días 20 y 30 son bajos.

Se discute la posibilidad de que el alto "turnover" de NA pueda estimular la liberación de LH y de PRL por mecanismos hipotalámicos y que los niveles altos de PRL pueden entonces estimular el "turnover" de DA, la cual inhibe la liberación de LH, contrarrestando el efecto estimulatorio de la NA sobre la liberación de LHRH (Höhn y Wuttke, 1.978). La inhibición dopaminérgica sobre la LH es aliviada en el momento de la pubertad, debido parcialmente a que los receptores de DA se insensibilizan a la acción del neurotransmisor. (Höhn y Wuttke, 1.979).

En condiciones normales, las catecolaminas no parece que ejerzan una acción directa sobre la LH y la FSH hipofisarias. Se ha observado que si se inyectan catecolaminas en los vasos periféricos no hay cambios en los niveles plasmáticos de estas hormonas, aún con métodos muy sensibles (Donoso, 1.975).

De igual manera, infundiendo estos compuestos directamente sobre la hipófisis, tampoco se altera su secreción (Kamberi y col., 1.970). Este hecho nos indica que los neurotransmisores influyen directamente sobre los cuerpos neuronales de las células productoras de los RF.

Se estudiaron los efectos de la DA sobre la liberación de LHRF "in vitro", en fragmentos del hipotálamo medio basal (Rotsztejn y col., 1.977). Adicionando ésta en concentraciones crecientes al medio de incubación, se observó que la liberación de LHRH de los fragmentos hipotalámicos era proporcional a la dosis administrada, pero para que se produjera esta liberación era necesaria la presencia de hormonas esteroídicas, ya que no se secretaba LHRH en machos castrados, cualquiera que fuera la cantidad de DA añadida al medio de cultivo.

Si, en vez de DA, se añadía NA no se observaba liberación de GnRH.

El efecto de la NA sobre la liberación de LH es estimulatorio; probablemente influya en la secreción del factor liberador de la hormona (LHRH) (Krieg y Sawyer, 1.976; Sar y Stumpf, 1.981).

Ultimamente (Parvizi y Ellendorff, 1.982) se le ha atribuido a la NA un doble papel, estimulatorio e inhibitorio, sobre la secreción de LH, observándose que la NA actúa de una

forma o de otra según la dosis y el área cerebral en la que se administra.

Sin embargo Jennes (1.982) opina que la influencia de la NA sobre la secreción de GnRH en la eminencia media es ejercida únicamente por medio de las neuronas tuberoinfundibulares dopaminérgicas.

En cuanto a la prolactina, se ha observado que el "turnover" de las catecolaminas (en particular el de la DA) durante el embarazo y la lactancia está acelerado, lo cual indica una relación inversa entre la actividad del sistema tuberoinfundibular de neuronas dopaminérgicas y la secreción de prolactina. La NA tiene poco efecto sobre la secreción de PRL. Hökfelt y Fuxe (1.972) observaron que la prolactina exógena estimula el "turnover" de la DA. En estas condiciones existe un "feedback" negativo sobre la hipófisis, y el aumento de la concentración de prolactina (exógena) acelera la liberación de DA, estimulando, en consecuencia, la secreción del PIF (factor inhibidor de prolactina) que bloquea la prolactina exógena.

La hormona hipotalámica que controla la secreción de prolactina es un factor inhibidor PIF, y una inhibición de éste produce un incremento de la secreción de PRL por la hipófisis.

Si se bloquean los receptores dopaminérgicos en el cerebro, decrece la secreción hipotalámica del PIF, incrementándose la secreción de PRL.

También se ha demostrado que existen receptores de DA en las células hipofisarias que segregan PRL. Estos receptores están bajo control hipotalámico, siendo éste un meca-



nismo regulador importante (Libertum y col., 1.980).

Cuando se inyecta DA en los vasos portales hipotálamo-hipofisarios o en el tercer ventrículo, se observa que se produce más PRL; esto indica que la DA actúa preferentemente a nivel hipotalámico.

Se puede decir, por tanto, que las catecolaminas tienen un papel estimulante de liberación del PIF hipotalámico, inhibiendo así la secreción de PRL. Como hemos dicho anteriormente, el PIF es la hormona hipotalámica dominante que controla la liberación de prolactina por la hipófisis.

El eslabón más "intrigante" en el problema de las catecolaminas y la actividad GnRH es quizás la presencia de catecolestrógeno en el SNC (Yen, 1.980). El cerebro, en especial el hipotálamo, es capaz de formar "in situ" 2-hidroxi-estrone (2OHE) y 2-hidroxiestradiol. Se ha demostrado que el estrógeno puede ser 2-hidroxilado por el tejido cerebral; esta reacción confiere una estructura catecol en el anillo aromático de la molécula del estrógeno. Este compuesto (catecolestrógeno) tiene las características del catecol y las del estrógeno, pudiendo interaccionar con las catecolaminas y con los estrógenos en el SNC. Los catecolestrógenos parece ser que interaccionan con los receptores estrogénicos e influyen sobre la actividad catecolaminérgica. Pueden inhibir la catecol-metil-transferasa (COMT) y la tirosina-hidroxilasa. Estos catecolestrógenos pueden influir, por tanto, en la síntesis y metabolismo de las catecolaminas en el cerebro y tienen un gran interés, entre los estrógenos y el sistema catecolaminérgico, en la regulación de la secreción de gonadotropina. Así se ha visto que la administración de 2OHE, en ratas macho o en hembras castradas induce un incremento en la

liberación de LH.

No se ha estudiado todavía el efecto endocrino de los catecolestrógenos en humanos; sin embargo se ha observado que hacia la mitad del ciclo menstrual de las hembras, hay una mayor excreción urinaria de catecolestrógenos; pero el efecto de este aumento sobre la liberación de LH está sin determinar.

#### 5.3.2. Otros reguladores de la secreción de gonadotropinas.

Los recientes avances en el campo de la investigación de los opiáceos han proporcionado una nueva dimensión para el entendimiento de la neuroendocrinología de la reproducción.

La  $\beta$ -endorfina ha sido localizada y cuantificada en el cerebro y en la hipófisis humana. Hay altas concentraciones de  $\beta$ -endorfina en el hipotálamo humano, sobre todo en el núcleo arqueado y en la eminencia media, y las concentraciones encontradas en la hipófisis son mucho más altas que en el hipotálamo. Dentro de la hipófisis, están localizadas en el lóbulo anterior y en el intermedio.

Es posible que estos péptidos modulen las funciones de las neuronas catecolaminérgicas, ya que los estudios realizados indican que puede haber receptores opiáceos en los terminales de las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas; no se sabe qué funciones desempeñan en la transmisión catecolaminérgica, pero parecen estar implicados en la regulación de las actividades de las neuronas GnRH (Yen, 1.980). Esta hipótesis está basada aún en datos preliminares muy limitados.

Se ha podido demostrar, en machos adultos normales, que las sustancias opioides inhiben la liberación de LH y aumentan la secreción de prolactina por el sistema hipotálamo-hipófisis; estos efectos son inhibidos por los antagonistas de los opioides, como la "naloxona". En cambio, en mujeres con ciclos menstruales normales, la administración de naloxona en la fase folicular temprana no induce cambios en la liberación de FSH, de LH ni de prolactina. Sin embargo, este sistema inhibitor sí es operativo en la fase luteal del ciclo, cuando tanto los estrógenos como la progesterona están aumentados. Por esto, es posible que los esteroides del ovario modulen las funciones reguladoras de las gonadotropinas, de las endorfinas hipotalámicas y la actividad neuronal catecolaminérgica.

Además de las aminas biógenas, hay otras sustancias que regulan la liberación de las gonadotropinas; estas sustancias son las prostaglandinas. El cerebro puede sintetizarlas y segregarlas, pero su papel en el cerebro no está aún claro. Parece que aumentan la tasa de descarga de ciertas neuronas, e inhiben otras, y sus efectos varían en las diferentes regiones del cerebro.

Estudios recientes (Ojeda y col., 1.978, 1.979) indican que la prostaglandina  $E_2$  interfiere la liberación de gonadotropinas.

Se ha sugerido que las prostaglandinas actúan directamente sobre las neuronas secretoras de LHRH induciendo la liberación de esta neurohormona (Harms y col., 1.976). En la EM se libera  $PGE_2$  en respuesta a la estimulación catecolaminérgica, y el bloqueo de la síntesis de PG suprime la descarga de LHRH (Ojeda y col., 1.979 ). La catecolamina que estimula

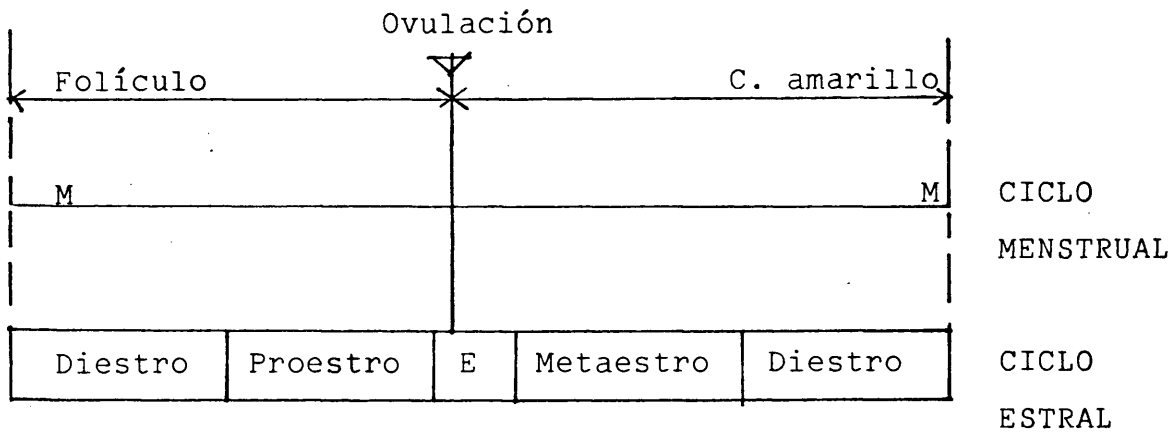
la liberación de  $PGE_2$  y de LHRH por los terminales nerviosos en la EM es la NA, que actúa sobre los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (Ojeda y col., 1.982).

#### 5.4. EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-OVARIO.

El hipotálamo, la hipófisis y el ovario constituyen un sistema integrado, en el que el ovario juega un papel secundario; es el encargado de suministrar señales a los otros dos componentes, los cuales controlan la liberación cíclica de las gonadotropinas; esta secreción hipofisaria está regulada por los esteroides del ovario, no sólo por mecanismos de retroalimentación negativa sino también positiva y estos efectos se tramitan a través de un centro del sexo que se encuentra en el hipotálamo (Michael, 1.980).

En el ser humano, en el período neonatal, los niveles de LH y de esteroides sexuales son relativamente altos; entre los dos y los cuatro meses de la vida postnatal se produce una subida detectable de FSH y de LH. Los niveles de gonadotropinas van disminuyendo gradualmente en los 3-4 años siguientes. Al llegar a la pubertad la secreción de FSH y de LH experimenta un incremento, siendo la cantidad de LH considerablemente mayor que la de FSH. (Michael, 1.980).

En las especies que ovulan espontáneamente, como la rata, los procesos endocrinos subyacentes son esencialmente los mismos que los del ciclo menstrual.

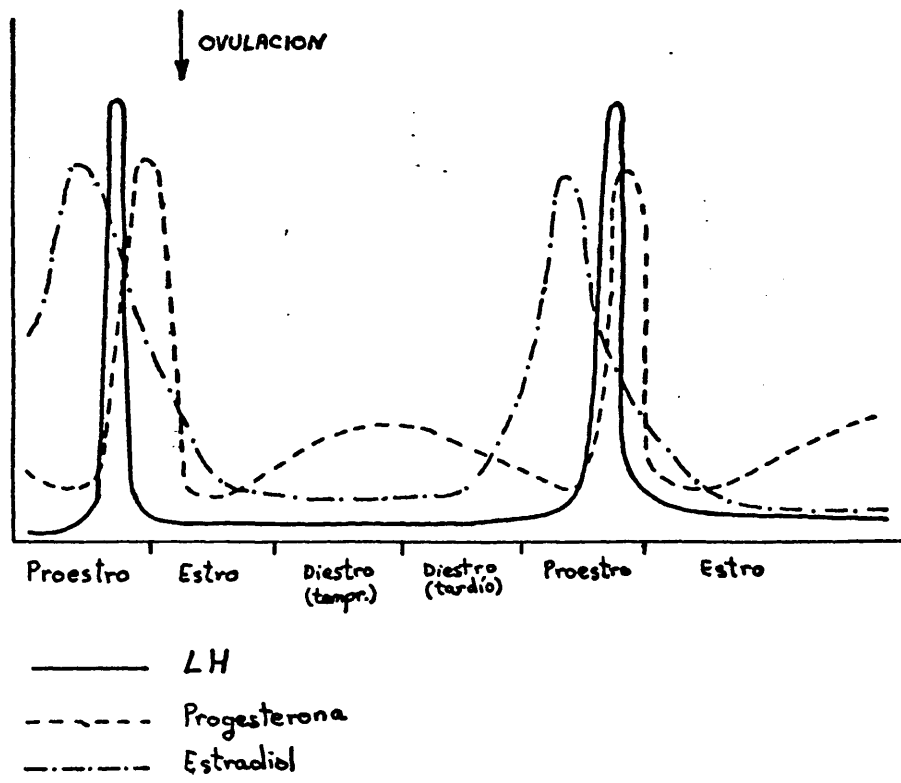


Diestro 60-70 horas; Proestro 1-2 horas; Estro 9-15 horas;  
Metaestro 10-14 horas. (en la rata)

Las ratas hembras presentan un ciclo sexual de 4-5 días; en el transcurso de éste, los niveles de estrógenos en el plasma determinan la secreción hipotalámica de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Esta, por su parte, dispara la secreción de LH por la hipófisis, y se produce la ovulación. La liberación preovulatoria de LHRH desde los terminales de la eminencia media en proestro, puede ser debida inicialmente a un aumento de la liberación de  $PGE_2$  por la NA, o bien a un incremento en la respuesta de estos terminales a la  $PGE_2$  (De Paolo, 1.982).

Cuando los niveles de estrógeno aumentan, se produce un aumento de progesterona, la cual facilita la lordosis; este comportamiento se manifiesta sólo cuando el animal está en celo.

Vamos a ver a continuación la acción de las gonadotro-



Ciclo estral de la rata.

pinas sobre el ovario.

La FSH, al principio, estimula la proliferación de las células granulosas y motiva que estas células adquieran una enzima aromatizante que transforma los andrógenos en estradiol, el cual actúa sinérgicamente con la FSH para estimular la proliferación de las células granulosas y el desarrollo de los folículos. A medida que las células granulosas aumentan en número, se incrementan los receptores de FSH, y aparecen los receptores para la LH. La LH actúa sobre las células de la teca induciendo la síntesis del andrógeno, que se difunde al fluido folicular, donde la mayor parte es aromatizado a estrógenos por las células granulosas.

Ultimamente se ha demostrado que la FSH estimula la aparición de receptores de prolactina en las células granulosas. El papel funcional de esta generación de receptores parece estar relacionado con la producción de progesterona por las células granulosas.

El descenso de FSH que ocurre en la última fase folicular puede deberse a un efecto de inhibición del estrógeno sobre la liberación de FSH por la hipófisis y, quizás también, a un incremento de la secreción de "inhibina" por el folículo que está madurando.

La existencia de "inhibina" y su efecto regulador sobre la secreción hipofisaria de FSH, también aportaría una explicación fisiológica de la secreción diferencial de FSH y de LH. Sin embargo, esto no ha sido aún probado. La gonadotropina hipotalámica, GnRH, regula diferencialmente la secreción de LH y FSH. Borrel y col. (1979) sugirieron que los mecanismos nerviosos que controlan la secreción de LH y

FSH no son idénticos, siendo la amígdala un importante centro de control para la diferente liberación de las dos gonadotropinas, lo cual está apoyado por otros trabajos (Kalra y col., 1.971; Motta y col., 1.971, 1.975; Zanisi y col., 1.975; Chappel y Barraclough, 1.976) que están en desacuerdo con la hipótesis de que una sólo hormona liberadora hipotalámica (LHRH) pueda ser la responsable del control de la secreción de las dos gonadotropinas (Schally y Arimura, 1.977). El patrón pulsátil de la liberación de gonadotropinas debe estar relacionado con el patrón de secreción de la GnRH.

#### 5.4.1. Catecolaminas y función ovárica.

Las neuronas noradrenérgicas ejercen una influencia estimuladora sobre la liberación de LH y PRL en ratas hembras (Weiner y Ganong, 1.978; Simpkins y col., 1.979, 1.980a). Se ha visto que la amígdala está involucrada en el control de la secreción de gonadotropinas, necesitando para ello impulsos noradrenérgicos y posiblemente dopaminérgicos (Borrel y col., 1.979) que llegan de otras regiones cerebrales y en particular del tallo cerebral (Raisman y Field, 1.971; Lammers, 1.972). La amígdala es rica en catecolaminas (Fuxe y Gunne, 1.974; Ungerstedt, 1.971; Eidelberg y Woodbury, 1.972; Brownstein y col., 1.974; Ben-Ari y col., 1.975) y en monoaminooxidasa (Kamberi, 1.973). La actividad de esta enzima fluctúa durante las diferentes fases del ciclo estral de la rata (Kamberi, 1.973).

Las hormonas ováricas, estradiol y progesterona, actúan sobre la hipófisis y el cerebro en una regulación "feedback" de la secreción de LH y de PRL (Goodman y Knabil, 1.981), participando en esta regulación los sistemas noradrenérgicos cerebrales.



Los antagonistas de la NA bloquean la secreción pulsátil de LH en ratas ovariectomizadas (Bhattacharya y col., 1.972; Weick, 1.978; Gallo, 1.980) ejerciendo un efecto inhibitor semejante al del estradiol (Blake y col., 1.974; Weick, 1.978). Igualmente el tratamiento con estrógenos en ratas ovariectomizadas inhibe la neurotransmisión noradrenérgica, como lo demuestra el decremento del "turnover" de NA en el hipotálamo (Donoso y col., 1.970; Honma y Wuttke, 1.980; Advis y col., 1.980).

Los inhibidores de la síntesis de NA y los bloqueadores de los receptores NA previenen la secreción de LH preovulatoria y la ovulación, en las ratas (Crowley y col., 1.978a), aboliendo el efecto estimulatorio del estradiol y de la progesterona sobre la secreción de LH y de PRL en las ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos (Kalra y col., 1.973, 1.978).

Esto sugiere que en el "feedback" negativo del estradiol sobre la LH está implicada la supresión de la neurotransmisión noradrenérgica central, mientras que el "feedback" positivo de las hormonas ováricas puede ser debido a un mejoramiento de la transmisión noradrenérgica.

No se sabe muy bien cuales son los lugares específicos en los que la NA central influye sobre la secreción de LH y de PRL en respuesta a las hormonas ováricas. Crowley (1.982) identificó como lugar prioritario en el cual las hormonas ováricas incrementan la actividad noradrenérgica, la región arqueado-eminencia media.

En cuanto a la DA, se ha visto que los estrógenos alteran la transmisión dopaminérgica estriatal (Hruska y Silbergeld, 1.980).

Los cambios en el "turnover" de la DA en la EM, inducido por las hormonas ováricas, pueden estar asociados a cambios en la secreción de prolactina, pero los efectos sobre la LH son contradictorios (Weiner y Ganong, 1.978). El "turnover" de la DA tiende a ser máximo después de un tratamiento prolongado con estrógenos, cuando los niveles de PRL son altos, mientras que un tratamiento corto con estrógenos reduce la DA en la circulación portal hipotálamo-hipófisis. Es posible que el efecto inhibitorio del estradiol sobre el "turnover" de la DA en la EM represente una acción directa del esteroide sobre las neuronas tuberoinfundibulares. (Crowley, 1.982).

La administración de progesterona en animales hembra ovariectomizados, primados con estrógenos, produce un incremento en los niveles de LHRH en el hipotálamo medio y basal, actuando predominantemente sobre las neuronas noradrenérgicas de la EM (Simpkins y col., 1.980; Wise y col, 1.981); se observa un incremento del "turnover" de la NA y no hay aparentemente cambio alguno en el de DA.

#### 5.4.1. Ovulación.

Se estudió el papel de las monoaminas cerebrales en la inducción de la ovulación. Se induce la ovulación en la coneja y en la rata mediante la inyección de A y NA en el tercer ventrículo cerebral (Schneider y Mc Cann, 1.970; Kamberi y col., 1.970), y este efecto es inhibido cuando se administran primero drogas bloqueantes adrenérgicas; esto sugiere que las catecolaminas actúan como estimulantes centrales más que como mediadores sinápticos.

En un principio, se pensó que la DA no tenía efecto sobre la ovulación, pero Kordon y Glowinski (1.972) descubrieron un mecanismo dopaminérgico en el control hipotalámico de la ovulación, a través de la eminencia media.

#### 5.4.3. Ciclo estral.

Durante el ciclo estral normal hay cambios cíclicos del contenido de NA en las porciones anterior y media del hipotálamo. Durante el proestro la NA es alta y cae significativamente después de la ovulación, alcanzando las concentraciones más bajas durante el estro.

Se estudió el "turnover" de la NA en varias áreas del cerebro durante los diferentes días del ciclo, en la rata, encontrándose que en el área media preóptica era alto en proestro y bajo en diestro, y en el hipotálamo basal anterior y posterior era también bajo en diestro, sobre todo durante las horas de la tarde (Honma y Wuttke, 1.980).

La DA, durante el "período crítico" del ciclo estral, aumenta en el área preóptica y en el núcleo arqueado (Keller y Lichtensteiger, 1.971).

La actividad dopaminérgica en el hipotálamo de ratas viejas (20-24 meses de edad) en estro constante, es menor que en las ratas jóvenes (3-4 meses de edad) también en estro. Esta disminución de la secreción de DA es debida probablemente a los niveles altos de prolactina en sangre (Reymond y col. 1.981).

Debido a estos cambios de las catecolaminas se estudiaron las enzimas implicadas en su metabolismo, para ver si existían variaciones cíclicas también en ellas. Se observó

que la MAO, en humanos, variaba entre la zona media del ciclo menstrual y la perimenstrual e igualmente la DBH mostraba una variación cíclica pero inversa a la que experimentaba la MAO (Redmond y col., 1.975). Posteriormente, se encontraron también variaciones en la actividad de la adenilato ciclasa, que es mayor en las hembras en metaestro que en proestro, y que en los machos adultos, comprobándose que la actividad de esta enzima era más alta cuando la concentración de estradiol era menor. In vitro, se observó que el estradiol reduce la actividad enzimática, y que esta reducción no es reversible, lo que hizo pensar que el efecto del estradiol se ejerce sobre el receptor (Ani y col., 1.980).

#### 5.4.4. Ovariectomía.

Después de la gonadectomía, aproximadamente a los 3 días, se observa un incremento de la concentración plasmática de LH.

El papel de las catecolaminas en el aumento de las gonadotropinas después de la castración no está claro. Hay una variación del "turnover" de las catecolaminas después de la castración que es anulada por los esteroides (Lofström y col., 1.977; Munaro, 1.977; Crowley y col., 1.978 a y b). Además, cuando disminuye la concentración de las catecolaminas se inhibe la subida postcastracional de LH y este efecto desaparece por administración de un precursor de NA (Ojeda y Mc Cann, 1.973). Otros autores (Carr y col., 1.975; Wise y col., 1.981) no observan cambios significativos en el "turnover" de las catecolaminas después de la castración. En cambio, Anton-Tay y Wurtman (1.968) describen una aceleración de la

síntesis cerebral de NA, así como un aumento de su "turnover". Esta hipótesis fue apoyada por el hecho de que los animales tratados con  $H^3$ -tirosina acumulaban  $^3HVA$ , y aumentaba la actividad de la enzima que cataliza la formación de catecolaminas (tirosina hidroxilasa) en animales castrados (Beattie y col., 1.972).

Greengrass y Tonge (1.975) observaron también que la gonadectomía produce cambios en el metabolismo de las catecolaminas, La concentración de normetanefrina se eleva significativamente, y la tasa de deplección de NA en el cerebro, después del bloqueo de su síntesis, está acelerada después de la castración. Estos autores sugirieron que las hormonas esteroídicas sexuales circulantes ejercen un efecto estabilizante sobre el almacenaje de catecolaminas en el cerebro.

Se realizaron investigaciones para ver cual de las dos gonadotropinas está implicada en el aumento del turnover de la  $^3HNA$ , estableciéndose que era la FSH la que tenía efecto, mientras que la LH no es activa (Anton-Tay, Pelham, Wurtman, 1.969). Por lo tanto, postularon que los mecanismos responsables del incremento de la síntesis y del "turnover" de la NA en el cerebro eran debidos, al menos en parte, a un efecto directo de los altos niveles en plasma de la FSH, y que el estradiol tenía capacidad para bloquear el efecto de la gonadectomía sobre la secreción de gonadotropinas. Sin embargo, Everitt y col. (1.975) observaron que los estrógenos disminuían el turnover de la NA en la corteza y en el tallo cerebral y que tanto los estrógenos como la progesterona bloqueaban "in vitro" la captura de la NA por el hipotálamo.

Parece ser que las hormonas gonadales modulan la actividad del sistema dopaminérgico en el cerebro (Savageau y

Beatty, 1.981).

Además se observó que la ovariectomía producía una disminución de la actividad de la adenilato-ciclasa y que los receptores de la DA en el cuerpo estriado y en el núcleo accumbens estaban deprimidos después de la castración (Kumakura y col., 1.979).

#### 5.5. EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS- TESTICULO

Las dos principales funciones testiculares son la secreción de hormonas esteroídicas y la gametogénesis. La primera se realiza en las células de Leydig y la segunda en los tubos seminíferos. Ambas están controladas por la hipófisis anterior, a través de la secreción de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona estimulante del folículo (FSH).

La hipófisis anterior, a su vez, es regulada por múltiples partes del SNC, que influyen sobre el hipotálamo, y éste segrega la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).

Los somas de las neuronas hipotalámicas secretoras de GnRH están localizados en dos zonas preferentemente, la región preóptica y la región arqueada. Esta hormona hipotalámica estimula la síntesis y liberación de las dos hormonas adenohipofisarias, si bien su efecto sobre la LH, en condiciones normales, es superior al ejercido sobre la secreción de la FSH.

##### 5.5.1. Células de Leydig.

La secreción de GnRH al sistema portal hipofisario no es constante. La secreción intermitente de GnRH origina a su

vez una liberación episódica de LH, pudiendo ser atenuada la frecuencia y amplitud de su secreción por los esteroides sexuales, o bien administrando GnRH.

La LH liberada se une a receptores específicos de la membrana de las células testiculares de Leydig. La interacción receptor-hormona estimula la adenilato ciclasa de la membrana, la cual cataliza la síntesis de AMPc. El AMPc se une a la subunidad reguladora de una proteína-quinasa, la cual entonces se disocia y activa a su vez la subunidad catalítica de esta enzima. La subunidad catalítica de esta quinasa de la célula de Leydig parece ser que facilita el paso de colesterol a pregnenolona y posteriormente a andrógenos.

La cantidad de testosterona sintetizada es primariamente dependiente de la cantidad de LH secretada en la sangre. La secreción de LH está recíprocamente controlada por la acción de los esteroides testiculares sobre el hipotálamo y sobre la hipófisis.

Cuando aumentan las concentraciones de andrógenos o de estrógenos en sangre, los niveles de LH disminuyen; ésta es la fase de supresión del "feedback" negativo. En cambio, si los niveles de esteroides gonadales disminuyen, la cantidad de LH secretada aumenta; ésta sería la fase de recuperación del "feedback" negativo. Ambas fases son reguladas a través de la interacción hipotálamo-hipófisis y las células de Leydig; así que los niveles de testosterona en sangre continúan relativamente constantes.

Los efectos del estradiol y de la testosterona sobre la liberación de LH son distintos. Así, si inyectamos estradiol vemos que se reduce la amplitud y aumenta la frecuencia de las descargas de LH, al contrario de la testosterona, la

cual reduce la frecuencia de las descargas de LH y aumenta su amplitud. Por lo tanto, parece ser que el estradiol y la testosterona ejercen efectos de "feedback" negativo sobre la secreción de LH por diferentes mecanismos.

Normalmente las gonadotropinas están reguladas por un "feed-back" negativo; pero existen desórdenes clínicos en los que el nivel de estrógenos es muy alto y persiste así durante mucho tiempo. En estos casos parece haber un "feed-back" positivo. (Bardin, 1.980)

#### 5.5.2. Tubos seminíferos.

En la lámina basal de los tubos seminíferos se encuentran, junto con las espermatogonias, las células de Sertoli. Estas células tienen varias funciones, como son:

- a) Fagocitosis de las células germinales dañadas.
- b) Sustento o nutrición de las células germinales que se están formando.
- c) Producción de proteínas, que son segregadas en el lumen de los tubos seminíferos.
- d) Mantenimiento de un fluido tubular rico en potasio y bicarbonato, para una mejor conducción del esperma.
- e) Sensibilidad a la acción hormonal.
- f) Síntesis de estradiol.
- g) Producción y secreción de inhibina.

Para la espermatogénesis es necesaria la existencia de las dos hormonas LH y FSH. La LH, al unirse a los receptores de las células de Leydig, hace que se produzca testosterona, la cual, junto con la FSH, actúa sobre los receptores



de membrana de las células de Sertoli, induciendo la espermatogénesis.

La FSH es probablemente segregada por las mismas células de la hipófisis que segregan LH.

La respuesta de la FSH a la GnRH cambia según la edad; así, se ha visto que al principio de la vida la respuesta es muy alta, disminuyendo de forma progresiva a medida que el individuo se acerca a la pubertad, por lo que al llegar a la madurez sexual la potencia de este péptido hipotalámico para la liberación de FSH es sólo 1/5 con respecto al de LH.

Se ha sugerido la existencia de una hormona liberadora de FSH diferente de la de LH, pero todavía no han podido aislarse estos principios por separado.

Después de la orquidectomía aumenta la secreción de FSH; esto indica que hay un factor en los testículos que controla la secreción de gonadotropina, de la misma forma que lo hacen los andrógenos y los estrógenos. Este factor, llamado "inhibina" por Mc Cullagh, está producido por las células de Sertoli y reduce la secreción de FSH.

#### 5.5.3. Prolactina en el macho.

La prolactina ha sido siempre asociada con la hembra; pero después del desarrollo de radioinmunoensayos específicos se observó que esta hormona está también presente en el plasma de los machos.

En el ser humano, la concentración de prolactina en el período neonatal es muy alta; pero se estabiliza aproximadamente a las 6 semanas y se mantiene así hasta la pubertad.

Se ha demostrado que la prolactina ejerce un pequeño

efecto sobre el tracto reproductivo de los machos, pero potencia significativamente la acción de la LH sobre las células de Leydig (Bardin, 1.980).

Aunque se han identificado receptores de prolactina en las células de Leydig, los mecanismos por los cuales ésta facilita la secreción de testosterona en respuesta a la LH se desconocen todavía.

Además de su acción sobre los testículos, la prolactina actúa, junto con la testosterona, como una hormona anabolizante sobre el tracto reproductor del macho y sobre otros tejidos que responden al andrógeno. Actúa, por tanto, sinérgicamente con la LH y con la testosterona para aumentar las funciones reproductoras del macho. Los individuos con hiperprolactinemia, tienen bajos niveles de testosterona y suelen ser impotentes, Se restaura la función sexual cuando se bajan las concentraciones de prolactina; el tratamiento con testosterona solamente no es efectivo, a menos que simultáneamente se consiga disminuir el nivel de prolactina.

No se conocen los mecanismos mediante los cuales la prolactina influye sobre la conducta sexual, pero se especula sobre la posibilidad de que esta hormona hipofisaria actúe directamente sobre el cerebro.

#### 5.5.4. Catecolaminas y esteroides androgénicos.

La regulación del sistema hipotálamo-hipófisis-testículo se debe, en parte a un "feedback" inhibitorio de los esteroides androgénicos sobre el hipotálamo, influyendo sobre la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (Davidson, 1.966). Se ha estudiado la acción de los esteroides

androgénicos sobre el SNC y sobre la hipófisis (Beyer y col., 1.972; Davidson y Sawyer, 1.961; Debeljuk y col., 1.972; Epstein y col., 1.977; Kingsley y Bogdanove, 1.973; Nagayama, 1.977; Ramirez y Mc Cann, 1.965), sugiriéndose que las estructuras límbicas podrían ser el asiento del "feedback" mediado por los esteroides, en las ratas macho (Pfaff, 1.968; McEwen y col., 1.970; Sar y Stumpz, 1.973; Parvizi y col., 1.977).

Se estudiaron los efectos provocados por los esteroides androgénicos sobre el contenido, en diferentes regiones cerebrales, de DA y NA, con el fin de dilucidar si las neuronas catecolaminérgicas están involucradas en el "feedback" negativo de los andrógenos. Para ello se inyectaban los andrógenos o bien se extirpaban las gónadas a los animales.

La administración de PT (propionato de testosterona) subcutáneamente a las ratas castradas, aparte de incrementar el contenido de LHRH y disminuir los niveles de FSH y LH, produce un decremento del turnover de NA en el hipotálamo medio basal (MBH) y una disminución de la DA en el área preóptica (POA). Estos cambios del turnover de la NA en la MBH después de la administración de PT parecen jugar un cierto papel en la regulación de la LHRH en el MBH. (Simpkins y col., 1.980b).

Entre el eje testículo-hipófisis y el sistema dopaminérgico central hay una correlación inversa. La administración de T hace disminuir el contenido de DA del hipotálamo y de la amígdala (Vermes y col., 1.979). La dihidrotestosterona, la norandrostenediona y la androstenediona producen efectos similares sobre el contenido de DA en estas dos

áreas del cerebro; en cambio la pregnenolona, esteroide sin efecto androgénico, no produce cambios en el contenido de DA del hipotálamo ni en el de la amígdala.

Si se disminuyen los niveles de las catecolaminas, por administración de  $\alpha$ -MPT, se observa que disminuye también el nivel de testosterona en plasma. Esto hace pensar que tanto la DA como la NA podían intervenir en la regulación del eje hipófisis-testículo (Naumenko y Serova, 1.976).

#### 5.5.5. Orquidectomía

La disminución del comportamiento sexual después de la castración de las ratas macho, es revertida por la administración de testosterona, bien sistemáticamente o directamente en la región preóptica anterior del hipotálamo.

Tanto la 5  $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) como los metabolitos estrogénicos de testosterona actúan directamente en el cerebro para activar el comportamiento sexual masculino, observándose, en ratas castradas, que la administración combinada de estradiol ( $E_2$ ) y DHT restaura la función sexual, tan pronto como la misma testosterona (Baum y col., 1.973; Feder y col., 1.974; Larsson y col., 1.973).

Baum y Starr (1.980) estudiaron si los efectos activantes de  $E_2$  o DHT sobre el comportamiento sexual de los machos podía estar ligado a un cambio en la transmisión de las sinapsis dopaminérgicas o serotoninérgicas en cerebro de rata, viendo que la vía por la cual la testosterona facilita normalmente el comportamiento sexual masculino es por

medio de una mejoría de la transmisión en las sinapsis dopaminérgicas.

Después de la orquidectomía hay un aumento de LH, causado probablemente por incremento de la actividad noradrenérgica en el cerebro (Ojeda y McCann, 1.973).

El "turnover" de NA en las ratas castradas aumenta en el cerebro total (Anton-Tay y Wurtman, 1.968), en el hipotálamo (Donoso y col., 1.967) y en la EM (Chiocchio y col., 1.976). Estos mismos autores no encontraron alteraciones en el contenido de DA ni de 5HT,

Fuxe y col. (1.969), usando una técnica semicuantitativa histofluorescente, observaron que, mientras que la castración no producía cambios en el contenido de DA, el tratamiento crónico con PT mejoraba la actividad de las terminaciones dopaminérgicas en la EM.

Por el contrario, Kizer (1.978) observó incremento del "turnover" de DA en la EM siete días después de la castración; pero no se encontraron cambios en el contenido de catecolaminas en el hipotálamo cuatro semanas después de la orquidectomía (Vermes y col., 1.979).

También se estudió el efecto de la castración sobre las enzimas biosintéticas de las catecolaminas: aumenta la actividad de la tirosina-hidroxilasa (Kizer y col., 1.974) pero no hay cambios en la actividad de la DA-  $\beta$  -hidroxilasa (Kizer y col., 1.976). Tampoco se altera la actividad triptófano-hidroxilasa.

## OBJETIVO DEL TRABAJO

El desarrollo y la maduración de los sistemas de control neural dependen de muchos factores; uno de ellos es, sin duda, el hormonal, pues los dos sistemas reguladores del organismo, el nervioso y el endocrino, están estrechamente relacionados. Los cambios comportamentales provocados por alteraciones en los niveles hemáticos de ciertas hormonas parecen deberse a los efectos de éstas sobre determinados circuitos del SNC y, más concretamente, sobre las zonas de empalme; es decir, sobre la transmisión sináptica.

Los sistemas dopaminérgicos y noradrenérgicos cerebrales están pobremente diferenciados en el momento del nacimiento, en la rata, y maduran gradualmente durante el período postnatal. Dicha maduración se manifiesta por un incremento de la concentración de catecolaminas en diversas regiones del cerebro y por el aumento de las actividades enzimáticas específicas para la síntesis y degradación de los neurotransmisores. Es precisamente en esta fase donde nos interesa estudiar el impacto de las hormonas sobre la evolución del proceso de maduración de los circuitos que utilizan DA o NA como neurotransmisores.

Como primera aproximación al problema analizamos las alteraciones que ocasiona la extirpación temprana de las cápsulas adrenales, del tiroides o de las gónadas, sobre la maduración de los sistemas catecolaminérgicos, reflejada por el contenido en DA y NA del diencéfalo y del resto del cerebro de los animales, después de la operación, a tiempos predeterminados.

## MATERIALES Y METODOS

## 1. PLANIFICACION EXPERIMENTAL

Primeramente se determinaron las concentraciones de DA y de NA, en cerebro entero y en el diencéfalo, en ratas machos y hembras por separado, a los 15, 30, 45 y 60 días de edad. Estos valores, que se refieren a animales normales, nos servirán de referencia para enjuiciar los resultados en animales adrenalectomizados, tiroidectomizados o gonadectomizados.

Las operaciones quirúrgicas correspondientes se realizaron el día del destete (23 días de edad). En varios animales de cada lote (machos y hembras) se realizó una operación ficticia, con objeto de comprobar que el "stress" quirúrgico no influye sobre los resultados.

Todos los animales, operados y pseudo-operados, fueron mantenidos en las mismas condiciones de luz y temperatura hasta el momento del sacrificio. Transcurrido el tiempo previsto (30, 45 y 60 días de edad) fueron decapitados, sin anestesia y siempre a la misma hora a fin de evitar posibles variaciones cíclicas de los niveles de las catecolaminas. A las hembras se les hizo un frotis vaginal y sólo se tomaron en consideración las ratas que se hallaban en diestro.

Inmediatamente después de la decapitación se extraían los cerebros, se separaba el diencéfalo siguiendo la técnica de Glowinski e Iversen y todo ello se conservaba congelado a  $-25^{\circ}$  C hasta el momento de proceder a su análisis, que siempre se hizo antes de transcurrir cuatro semanas.

Para la extracción y valoración de las muestras seguimos el método de Welch y Welch, que permite la determinación simultánea de DA y NA en pequeñas porciones de tejido



nervioso. En una alicuota del homogenado inicial se valoran las proteínas. Para la valoración espectrofluorimétrica de las aminas tuvimos en cuenta que, dentro del intervalo de 0,1 - 0,5ug/ml, las concentraciones son proporcionales a las intensidades de la fluorescencia.

Los coeficientes de recuperación que obtuvimos con este método fueron del 88% para la dopamina y del 82% para la noradrenalina.

## 2. ANIMALES

Se utilizaron ratas machos y hembras de la especie *Rattus norvegicus*, variedad albina, raza Sprague-Dawley de quince, treinta, cuarenta y cinco y sesenta días de edad.

Los animales se destetaban a los veintitrés días de edad y se separaban en cuatro subgrupos para realizar en uno de ellos la adrenalectomía, en otro la tiroidectomía y en otro la gonadectomía (orquidectomía y ovariectomía) manteniendo un grupo control.

Todos los animales dispusieron de comida y agua "ad libitum" siendo en los animales adrenalectomizados sustituida el agua de la bebida por una solución salina al 0,9 %

### 2.1. ANESTESIA

Las ratas son anestesiadas con éter etílico anestésico, y mantenida la anestesia mediante un vaso de precipitado de 25 ó 50 ml. conteniendo algodón empapado con dicho anestésico.

### 2.2. ADRENALECTOMIA

Se colocó la rata anestesiada en la mesa de operaciones, y pasamos a depilar la región. Una vez realizado esto, se hizo una incisión en la piel a la altura de la línea media corporal, en el ángulo que forman las costillas inferiores con los músculos vertebrales. La piel debe separarse a la derecha e izquierda para extirpar ambas glándulas adrenales. Descubierta ya la musculatura paraventral lumbar, se

hace una incisión en la capa muscular, localizamos el riñón y la glándula adrenal, que es un cuerpo amarillento embebido en grasa y tejido conectivo, que se encuentra encima de la región superior del riñón. Por medio de unas pinzas finas y curvas se sujeta la grasa circundante y disecamos la glándula adrenal. Igualmente se procede con el otro lado del animal. Hay que tener en cuenta que en el lado derecho la región superior del riñón queda cubierta por un lóbulo del hígado, por lo que hay que elevar éste para alcanzar el riñón y sujetar la glándula adrenal y la grasa circundante. Una vez extirpada la glándula se cierran las aberturas musculares y de la piel mediante suturas discontinuas.

### 2.3. GONADECTOMIA

#### 2.3.1. OVARIECTOMIA

Se localiza el lugar de incisión a nivel de la zona paraventral lumbar. Se depila al animal en esta zona y se hace una única incisión central en la piel. Una vez separada la masa muscular dorsal se localiza el ovario, que se encuentra insertado en un acúmulo de grasa. Después de ligadas las venas y arterias ovárica y uterina, se extirpa el ovario.

Finalizada la operación quirúrgica se cierra la incisión practicada en el músculo mediante suturas discontinuas y se repite la misma operación en el lado opuesto. Por último se realiza una sutura en la primera incisión central practicada en la piel.

### 2.3.2. ORQUIDECTOMIA

El animal una vez anestesiado se coloca en posición ventral, se le hace una incisión en el centro del saco escrotal. Una vez fuera el testículo, se separa del epidídimo y se hace una ligadura en el cordón espermático; a continuación se extirpa el testículo. Después de realizada la operación se cerrará la incisión de la piel.

### 2.4. TIROIDECTOMIA

Manteniendo el animal bajo anestesia, se le hace un corte de 1 cm. aproximadamente por encima de la horquilla del esternón. Se separan con pinzas la aponeurosis y los músculos prelaríngeos, y se extirpa el istmo y los lóbulos tiroideos, teniendo cuidado de no dañar el nervio recurrente. A continuación se cose la piel.

Después de suturar la herida, los animales fueron sometidos a un tratamiento desinfectante con tintura de merthio<sub>7</sub> lato. Por último, eran reintegrados a sus jaulas, recuperándose de la operación en un corto espacio de tiempo.

Los animales tiroidectomizados fueron sometidos diariamente a un control de peso.

### 3. REACTIVOS Y APARATOS

Los reactivos utilizados han sido normalmente de la casa MERCK o SIGMA, con grado de pureza para análisis.

La relación de los reactivos utilizados en el proceso experimental, especificando casa comercial, conservación y modificaciones, en el caso en que éstas hayan tenido lugar, se detalla en el apéndice I.

Los aparatos utilizados se relacionan en el apéndice II.

APENDICE I

REACTIVO	CASA COMERCIAL	Mantenimiento y modificaciones posteriores
Ac. acético glacial ( $\text{CH}_3\text{-COOH}$ ) 98%	Merck	Tª ambiente
Ac. ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ )	Merck	Tª ambiente
Ac. clorhídrico ( $\text{ClH}$ )	Merck	Tª ambiente
n-butanol ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_3\text{OH}$ grado fluorométrico)	Merck	Tª ambiente
Carbonato sódico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Panreac	Tª ambiente
Cloruro sódico ( $\text{ClNa}$ )	Merck	Tª ambiente
Eter dietílico ( $\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$	Merck	Tª ambiente
Etilendiamino tetra- cetato, sal disódica (EDTA)	Merck	Tª ambiente
Etilendiamina ( $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2$ )	Merck	Destilación y Tª de 0-4º C.
Folin-Ciocalteau	Panreac	Tª ambiente
Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H.12 H}_2\text{O}$ )	Merck	Tª ambiente
Fosfato monosódico ( $\text{Na PO}_4\text{H}_2\text{.H}_2\text{O}$ )	Merck	Tª ambiente
n-Heptano ( $\text{C}_7\text{H}_{16}$ espectroscopía)	Merck	Tª ambiente
Hidróxido sódico ( $\text{NaOH}$ )	Merck	Tª ambiente
3-hidroxitiramina HCl ( $\text{DAHCl}$ )	Sigma	Desecador Tª 0-4º C.
Iodo metálico	Probus	Tª ambiente

Ioduro sódico (INa)	Merck	Tª ambiente
Noradrenalina bitartrato (NA)	Sigma	Desecador Tª 0 - 4º C.
Seroalbúmina bovina	Sigma	0 - 5º C
Sulfato de cobre (SO <sub>4</sub> Cu. 5H <sub>2</sub> O)	Panreac	Tª ambiente
Sulfito sódico (SO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> . 7H <sub>2</sub> O)	Merck	Tª ambiente
Tiosulfato sódico (S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> . 5H <sub>2</sub> O)	Merck	Tª ambiente

---

## APENDICE II

### APARATOS

Agitador magnético Invester con varilla imantada cubierta de teflón.

Agitador mecánico de tubos Gricell.

Balanza de precisión Sauter tipo 404/11.

Centrífuga MSE 01491 A.

Colorímetro Spectronic 20-Bausch-Lomb.

Estufa Memmert.

Espectrofluorímetro Perkin-Elmer mod. 150 equipado con cubetas de cuarzo de 3 ml. de capacidad.

Homogeneizador de vidrio potter.

Potenciómetro Beckman para medir pH.



#### 4. EXTRACCION Y DISECCION DEL ENCEFALO.

##### 4.1. MATERIAL NECESARIO

Guillotina  
Tijeras finas y gruesas  
Pinzas finas y gruesas  
Bisturí  
Placa petri  
Hielo picado  
Balanza  
Congelador a -25° C.

##### 4.2. EXTRACCION DEL ENCEFALO

Los animales se sacrificaron sin anestesia con el fin de evitar alteraciones de las catecolaminas, por decapitación con guillotina, a nivel de la primera y segunda vértebra cervical. La decapitación se realizó a la misma hora siempre para prevenir, en lo posible, los cambios producidos por el ritmo circadiano en los niveles de las aminos.

Inmediatamente despues del sacrificio, se procede a la extracción del encéfalo. Se efectúa una incisión longitudinal de la piel de la cabeza de la nuca al hocico. Una vez retirada la piel se disecan los músculos dorsales de la nuca.

Se introduce la punta de unas tijeras finas en los márgenes laterales del agujero occipital, de forma latero-dorsal al bulbo raquídeo y en dirección oblicua hacia el conducto auditivo externo. Con unas pinzas se separa el hueso occipital, haciendo presión hacia afuera, y del mismo modo se levantan los parietales, haciendo tracción hacia arriba. Nor-

malmente al separar los parietales se desprende al mismo tiempo la duramadre, dejando accesible el cerebro. De no ser así, se corta longitudinalmente la duramadre en la dirección del espacio interhemisférico y se separa posteriormente hacia los lados con unas pinzas finas.

Una vez aislada la porción dorsal del cerebro, se seccionan los nervios olfatorios mediante una espátula roma que se pasa por debajo y por delante de la sutura fronto-parietal. Posteriormente se seccionan los fascículos ópticos, las arterias carótidas, el tallo hipofisario y los nervios craneales que salen a uno y otro lado del tronco cerebral, con lo que queda libre el encéfalo, que se pasa por una solución salina isotónica muy fría. Esta operación se realiza en un período máximo de treinta segundos.

#### 4.3. AISLAMIENTO DEL DIENCEFALO

La disección se realiza según Glowinski e Iversen, (1.966). Para ello se coloca el encéfalo en una placa petri con hielo y se realizan cinco cortes: dos anteroposteriores a los lados del hipotálamo, uno perpendicular a éstos por el quiasma óptico y otro, también perpendicular, por delante de los cuerpos mamilares. El quinto corte es horizontal, para separar la parte superior, correspondiente a la corteza.

El encéfalo o sus partes se depositan sobre una lámina de parafilm, se pesan y se almacenan a -25° C hasta el momento de su procesamiento para análisis bioquímico.

El tiempo máximo de almacenaje fue de una duración de cuatro semanas, observándose que cuando se sobrepasaba este tiempo, había unas pérdidas considerables, sobre todo de X DA, que parece ser la amina cerebral más lábil.

## 5. ESTUDIOS BIOQUIMICOS

### 5.1. OBTENCION DEL TEJIDO PARA LA DETERMINACION DE AMINAS (DA, NA)

#### 5.1.1. MATERIAL

Acido clorhídrico 0,01 N, frío

Acido clorhídrico 3 N

Tampón fosfato 0,5 M, pH = 7,3

n-Butanol, grado fluorimétrico, frío

EDTA al 10 %

n-Heptano

Eter dietílico

Hielo

Homogeneizador de vidrio potter

Tubos de centrífuga de vidrio de 40 ml.

Tubos de centrífuga de vidrio de 70 ml.

Papel indicador de pH 3,5 - 4

#### 5.1.2. METODO

Nos basamos en el método de Welch - Welch (1.969). El encéfalo o sus partes se homogeneizan en un potter, introducido en un baño de hielo, con 3 ml. de ClH 0,01 N muy frío; y 0,1 ml de EDTA al 10 %, agente quelante de iones Ca libres y otros cationes divalentes; El homogenado se vierte en un tubo de centrífuga de 40 ml de capacidad, que contiene 25 ml de butanol y 4 g. de ClNa, siendo a continuación agitados en un agitador magnético de varilla imantada recubierta de teflón e introducidos en un baño de hielo durante 10 minutos; posteriormente se centrifuga a 3.000 r.p.m. ( 1,500 g ) durante 10 minutos.

El butanol sobrenadante se extrae y se pone en un tubo de centrífuga de 70 ml de capacidad, en el que se había echado 40 ml de heptano y 2 ml de tampón fosfato 0,5 M pH 7,3. Después de agitar los tubos durante 10 minutos se procedió a centrifugar por segunda vez a 2.000 r.p.m. (1.000 g ) durante 10 minutos.

La fase acuosa se extrae del fondo del tubo mediante pipeta, y se pone en otro tubo, en el que se acidifica con ClH 3 N hasta pH 3,5 - 4; después se le añade 20 ml de éter dietílico, se agita y se centrifuga a 2.000 r.p.m. (1.000 g ) durante 8 minutos.

De la capa acuosa del fondo del tubo, se extrajeron mediante pipeta de 0,5 cc de capacidad, alícuotas para la determinación fluorimétrica de la DA y NA.

## 5.2. ESTANDARES

Se preparó una solución madre de clorhidrato de DA y bitartrato de NA de 100 ug/ml, que se conservó en frío, con una vida media de un mes.

En el momento de las valoraciones se preparó una solución de 1 ug/ml, a partir de la cual se realizaron las diluciones correspondientes obteniendo concentraciones que oscilaban entre 0,3 y 0,5 ug/ml.

Los estándares internos fueron preparados homogeneizando dos cerebros enteros en 8 ml de ClH 0,01 N. Del homogeneizado se toman cuatro alícuotas de 2 ml. A dos de ellas se les añadió 1 ml de solución estándar de 0,5 ug/ml y 0,1 ml de EDTA al 10 % (estándares internos), mientras que a los otros dos se les añadió 1 ml de ClH 0,01 N y 0,1 ml de EDTA al 10 % (problemas normales). Los cuatro problemas fueron so-

metidos al proceso de extracción descrito anteriormente.

La recuperación fue medida frente a estándares de 0,5 ug/ml.

### 5.3. VALORACION DE PROTEINAS

#### 5.3.1. FUNDAMENTO

El método utilizado es el de Lowry (1.951). Es un método colorimétrico, que se basa en la formación de un complejo coloreado. La reacción coloreada se provoca mediante el reactivo de Folin (fosfomolibtúngstico), que es específico de grupos fenólicos e interacciona con los grupos fenólicos de la tirosina.

Es necesaria la presencia de iones cobre, los cuales se unen a las proteínas formando el complejo "Cu-proteína" dejando accesibles los grupos tirosina al reactivo de Folin. Este complejo reduce al reactivo de Folin dando un compuesto coloreado, siendo máxima la producción de color a pH = 10.

#### 5.3.2. REACTIVOS

- 1)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2 % en NaOH 0,1 N
- 2)  $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 5 % en tartrato sódico potásico al 1 % (en agua destilada)
- 3) Solución alcalina de cobre. Preparada el mismo día del ensayo mezclando 50 ml del reactivo nº 1 con 1 ml del reactivo nº 2.
- 4) Solución cobre-carbonato. Es exactamente la misma solución nº 3, pero preparada con la omisión de NaOH en el reactivo nº 1. Se utiliza solamente

te en casos en que la proteína no sea soluble y para su solubilización ha sido necesario digerirla con un álcali.

- 5) Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido: un volumen de reactivo Folin-Ciocalteu (Merck) más dos volúmenes de agua destilada.
- 6) Solución madre. Se preparó una solución de seroalbúmina bovina (250 mg/25 ml) en agua destilada y se guarda congelada.
- 7) Solución estandar. El día del ensayo se prepara diluyendo 1 ml de la solución madre (10 mg) hasta 20 ml con agua destilada. Se mezcla levemente. Esta solución contiene 0,5 mg de proteína/ml.

#### 5.3.2. PROCEDIMIENTO

Del homogenado en ClH se tomó 0,2 cc y se puso a evaporar el ClH en la estufa. Posteriormente se le adiciona 10 ml de NaOH 1 N para el caso del cerebro-diencéfalo, mientras que para el diencéfalo fue de 5 ml de NaOH 1 N.

Se digiere durante 15 minutos a 100° C y se deja enfriar, midiéndose el volumen final para los cálculos posteriores. Se toman alícuotas de 0,5 cc y se les adiciona:

- 1º) 1 ml. de H<sub>2</sub>O destilada.
- 2º) 5 ml. de solución cobre-carbonato (nº 4), se mezcla por inversión y se deja pasar 15 minutos después de añadido el reactivo.
- 3º) 0,5 ml. de reactivo de Folin.

Se agitan los tubos y se deja reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente para que se desarrolle la

reacción coloreada. Igualmente se hizo con la solución estandar y con el blanco. Tanto a uno como a otro se les adicionó 0,5 cc de NaOH 1 N.

Se leyó la densidad óptica a 500 nm.

Se construyó una curva de calibrado mediante las soluciones estandar de 0,1 - 0,5 mg de proteína, representando absorbancias frente a concentraciones. En esta gráfica se interpolan los valores obtenidos en la solución problema para obtener su concentración.

#### 5.4. ENSAYOS FLUORIMETRICOS PARA CUANTIFICAR LAS CATECOLAMINAS (DA, NA)

##### 5.4.1. BASES TEORICAS DEL PROCESO DE FLUORESCENCIA

El proceso de fluorescencia se caracteriza por dos espectros: el de absorción y el de fluorescencia.

Cuando un quantum de luz golpea a una molécula, es absorbido aproximadamente en  $10^{-5}$  seg. Si la energía de la molécula aumenta lo suficiente, se llevará a cabo una transición electrónica hacia un estado electrónico superior. Estas transiciones son las responsables del espectro de absorción ultravioleta. Este estado excitado persiste por un tiempo finito, del orden de  $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  seg. Durante este intervalo, cualquier energía absorbida en exceso, se disipa rápidamente. Pasado este corto lapso de tiempo, el cual es característico para la molécula, los electrones regresan al nivel electrónico normal.

La transición del estado singlete excitado a uno de los niveles vibracionales dentro del estado normal, lleva a una liberación de energía y hace surgir la emisión fluores-

cente. El espectro de la emisión fluorescente aparecerá en el lado de la frecuencia más baja que la banda de absorción.

La distribución espectral de la radiación de fluorescencia es una característica física absoluta para una sustancia determinada y es muy útil en determinaciones cualitativas. La intensidad de la emisión de fluorescencia a una determinada longitud de onda es proporcional a la concentración de la molécula, por lo que ofrece grandes posibilidades analíticas cuantitativas.

La fluorescencia se puede ver afectada por diversos factores, entre los cuales hay que tener presente las sustancias absorbentes y no fluorescentes, el medio físico circundante, el tiempo, el pH, agentes amortiguadores etc.

Tanto el espectro de excitación como el espectro de emisión deben determinarse antes de hacer cualquier tipo de determinación experimental.

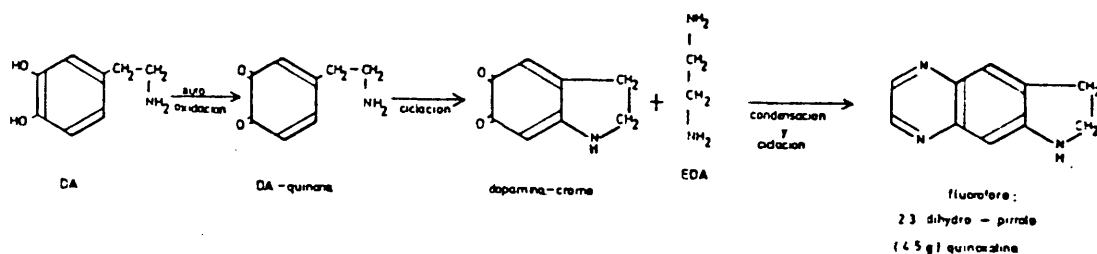
#### 5.4.2. ENSAYO FLUORIMETRICO DE DOPAMINA (DA)

La DA, como el resto de las catecolaminas, puede ser medida fluorimétricamente usando uno de los tres principales ensayos.

a) Fluorescencia nativa. Basado en la fluorescencia de las catecolaminas a 285/325 nm con un pH óptimo de 1. Fue utilizado para medir catecolaminas totales en tejidos como la glándula adrenal (Bertler y col., 1.958). Sin embargo, para otras aplicaciones, este ensayo es poco sensible y específico.



b) Condensación con etilendiamina (EDA)

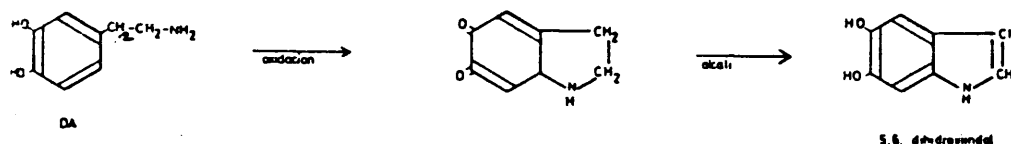


Este ensayo está basado en la autooxidación de las catecolaminas a un derivado químico, seguido de una condensación con EDA dando el fluoróforo.

Este método fue utilizado al principio para la medida total de las catecolaminas, siendo calculada la DA por la diferencia de valores obtenidos por este método, entre las catecolaminas totales y los de A y NA calculados por el método trihidroxiindol.

Más tarde, con la introducción del método trihidroxiindol para la DA (Carlsson y Waldeck, 1.958), que presenta un alto grado de especificidad, el método anterior pierde importancia. Sin embargo, usando un procedimiento de purificación con el cual separásemos la DA de las otras catecolaminas se puede utilizar el método de la "condensación con EDA" con un mejoramiento en la sensibilidad y especificidad (Lavery y col., 1.968).

c) Método del dihidroxiindol



Introducido por Carlsson y Waldeck (1.958) y usado para medir DA en cerebro. Este método está basado en la oxidación controlada de DA a un cromo-derivado, el cual sufre un reagrupamiento molecular en una solución fuertemente alcalina, en presencia de un agente reductor y estabilizante.

Carlsson y Waldeck establecen que acidificando la solución después de la formación del fluoróforo, había una fluorescencia muy intensa a longitudes de onda mucho más bajas que la A y NA.

El método hidroxindol para la DA introducido por Carlsson usaba solución de iodo como oxidante y sulfito como agente reductor y estabilizante, con una acidificación final. Este constituyó el primer y más convincente tipo de ensayo fluorimétrico para la DA con un alto grado, no sólo de especificidad, sino también de sensibilidad.

El método utilizado en el presente trabajo es el descrito por Welch y Welch (1.969) para la determinación simultánea fluorimétrica de DA, NA, 5HT y 5 HIA en cerebro o sus partes.

Este método está basado en el descrito por Carlsson y Waldeck en 1.958 con algunas modificaciones.

#### 5.4.2.1. MATERIAL

Tampón acetato 2 M, pH = 6,8

Solución de Iodo 0,1 N, mantenida a la temperatura de 6 - 7° C.

Solución sulfito alcalino/EDTA.

Reactivo ClH/ácido acético. ClH concentrado y ácido acético glacial fueron mezclados en la proporción 1:1.

Estandar o patrón de DA (3 hidroxitiramina) de  
1 ug/ml.

H<sub>2</sub>O destilada.

Todos los reactivos y el agua destilada fueron guardados en frascos de vidrio provistos de tapones del mismo material, ya que se observó que el plástico producía contaminantes fluorescentes.

#### 5.4.2.2. TECNICA

El proceso lleva consigo tres etapas:

1) Oxidación de la muestra con iodo a un pH alrededor de 6,5.

2) Reestructuración intramolecular, por adición de una solución alcalina de sulfito sódico, en la que el sulfito sódico actúa como agente reductor para detener la oxidación y como protector del compuesto fluorescente formado en medio alcalino.

Para este propósito se ha utilizado por otros autores el ascorbato, pero presenta el problema de que interfiere con la fluorescencia.

3) Ajuste del pH aproximadamente a 3,8. Este paso tiene por misión el aumento de la fluorescencia. Para la acidificación final se ha utilizado tanto el ácido acético (Carlsson y Waldeck, 1.958) como el ácido clorhídrico (Anton y Sayre, 1.964; Fleming y colaboradores, 1.965).

Welch y Welch propusieron la utilización de una mezcla isovolumétrica de ClH y acético que permite conseguir una variabilidad pequeña en el pH de las muestras, con poca cantidad de ácido. Esto es de gran importancia, debido a que un pequeño cambio en el pH, va a hacer variar notable-

mente la intensidad de la fluorescencia (Fig. 1).

El desarrollo de la fluorescencia es lento. Para acelerarlo se pueden introducir las muestras en un baño de agua hirviendo durante 45 minutos, ya que se comprobó que daba mayor fluorescencia que si se irradiaba (Fig. 2).

Pasado este tiempo, se sacan las muestras y se dejan enfriar. A continuación se leen a una longitud de onda de excitación y emisión respectivamente a 335/380 nm.

El fluoróforo fue estable durante 6 - 8 horas, pero normalmente la lectura se hizo en el mismo momento. Este método permite detectar cantidades de DA superiores a 10 ng.

En el presente ensayo se emplean:

Blancos de oxidación ( $B_{oxi}$ ). Nos dan la fluorescencia debida a los reactivos.

Estandar o patrones externos ( $ST_{ex}$ ) a los que se añaden 500 ng de DA. Sirven como referencia en la lectura espectrofluorimétrica.

Tubos de oxidación por cada muestra.

Uno experimental, M, otro el estandar interno en el que se añaden además de la muestra 500 ng de DA, y otro el blanco de tejido ( $B_t$ ) donde se impide la oxidación de la muestra por adición de los reactivos en orden inverso.

La técnica del ensayo fluorimétrico se describe en el protocolo adjunto.

Efecto del pH en el desarrollo e intensidad de la fluorescencia del fluoróforo de DA

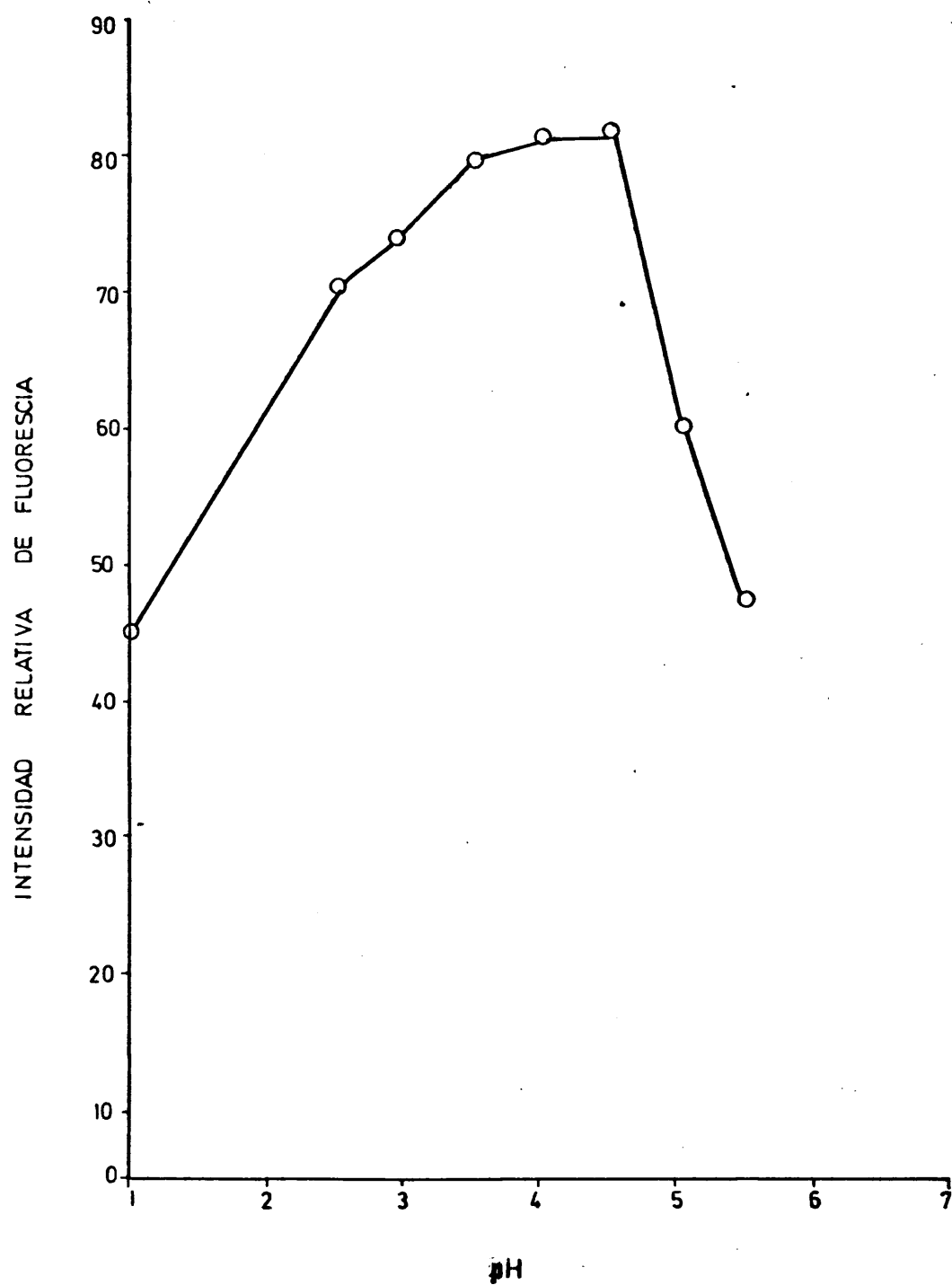
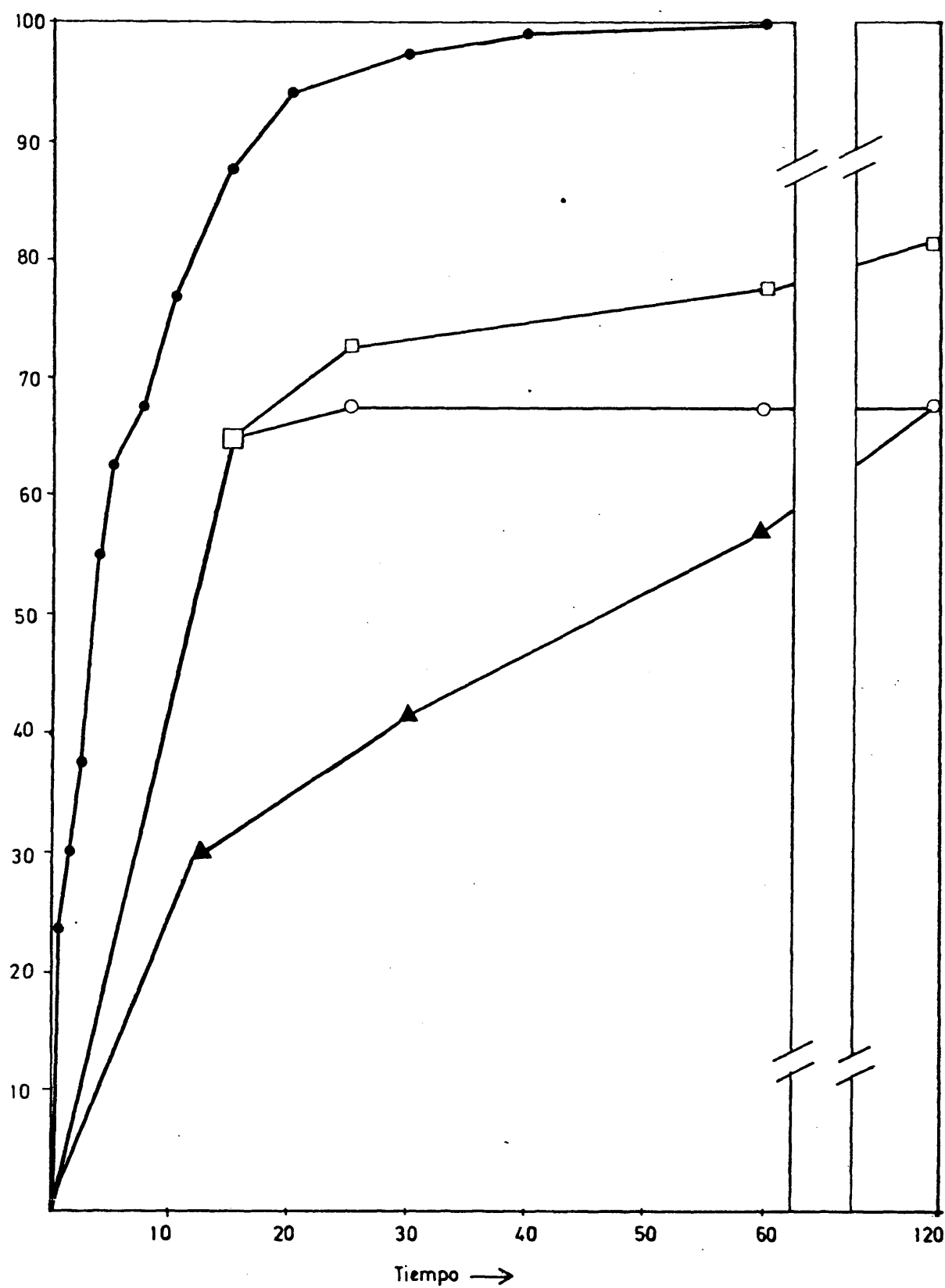


fig.1

Efectos de la luz y del calor en el desarrollo del  
fluoróforo de Dopamina

- Introducción en agua hirviendo
- Exposición a la luz ultravioleta de onda larga
- ▲ Exposición a la luz ultravioleta de onda corta
- Exposición a la luz fluorescente



PROTOCOLO PARA LA DETERMINACION FLUORIMETRICA DE DOPAMINA (DA)

Welch (1.969)

	B <sub>oxi</sub>	M	ST <sub>ex</sub>	B <sub>t</sub>
DA 1 ug/ml	-	-	0,5	-
Buffer acetato *	0,5	0,5	0,5	0,5
H <sub>2</sub> O	1	1	1	1
Iodo 0,1 N *	0,1	0,1	0,1	-
Sulfito alcalino/EDTA	-	-	-	0,2
Esperar 3 - 4 minutos				
Sulfito alcalino/EDTA *	0,2	0,2	0,2	-
Iodo 0,1 N	-	-	-	0,1
Esperar 3 - 4 minutos				
ClH/ácido acético *	0,25	0,25	0,25	0,25

Baño de agua hirviendo durante 45 minutos

Enfriar a temperatura ambiente

Leer a 335/380 nm.

Volúmenes expresados en ml.

\* Agitar mecánicamente.

#### 5.4.3. ENSAYO FLUORIMETRICO DE NORADRENALINA (NA)

La NA, al igual que la DA, puede ser medida fluorimétricamente por tres tipos de ensayos: Fluorescencia nativa, condensación con EDA y el método trihidroxiindol, que es actualmente el más utilizado.

a) Fluorescencia nativa. Ya explicada anteriormente.

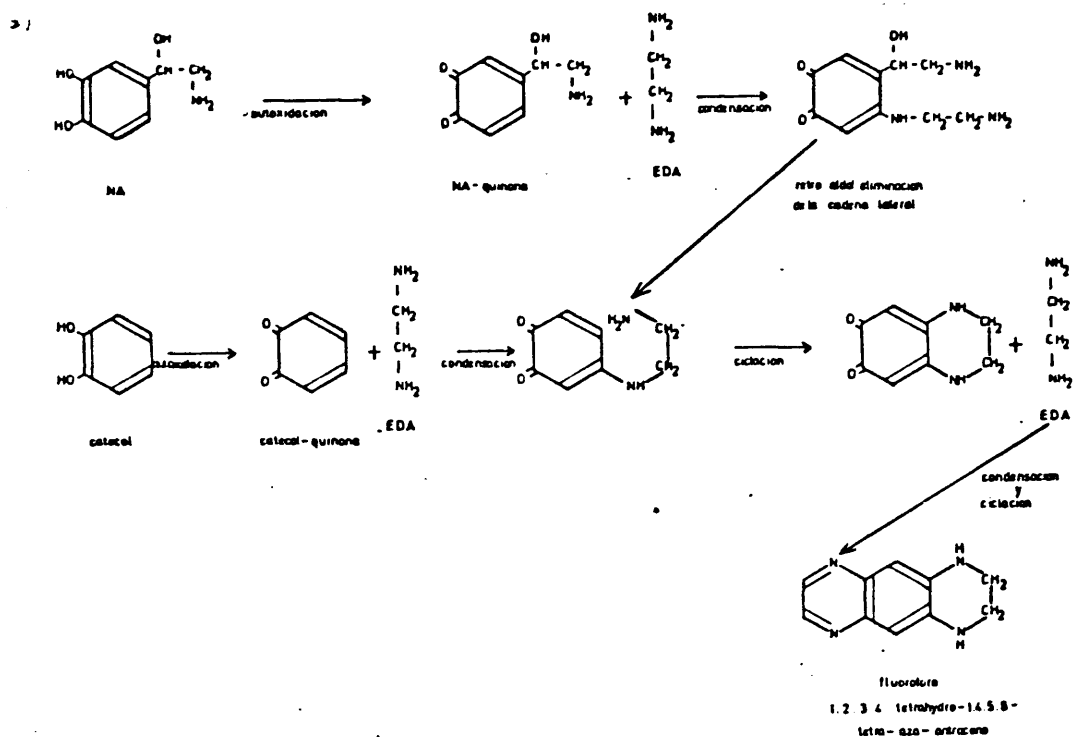
b) Condensación con EDA.

El fundamento de este método es el mismo que el descrito para la DA pero presenta ciertas particularidades. Hay que tener en cuenta que la razón EDA/catecolamina es importante para la formación de un fluoróforo óptimo, variando por tanto el mecanismo de condensación para las diferentes catecolaminas, ya que una molécula de un derivado quinónico puede condensarse con una o más moléculas de EDA, dependiendo de la naturaleza de la cadena lateral.

En el caso de la NA, una molécula de EDA se condensa con la de NA-quinona en la posición 6. A continuación se produce la ciclación por la cadena lateral de EDA, después de haberse eliminado la cadena lateral de NA por una reacción "retroaldólica", dando el mismo derivado que el catecol. Seguidamente hay una nueva condensación con una segunda molécula de EDA por los grupos "quinónicos", formándose idénticos fluoróforos para la NA que para el catecol. La eliminación de la cadena lateral es facilitada por la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono adyacente al ciclo del benceno, pero la eliminación no ocurre siempre que existe este grupo (como en el caso de la A). En ésta, la cadena lateral de A-quinona cicla muy rápidamente a la forma adrenocromo, a pesar de tener un grupo hidroxilo en el carbono apropiado, y solamente es utilizada una molécula de EDA para la formación del

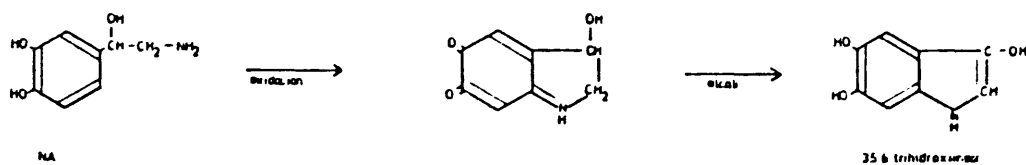


fluoróforo.



### c) Método del trihidroxiindol.

El es más utilizado, debido a que los anteriores presentan una gran interferencia con la DA. Este método tiene el mismo fundamento que el del hidroxindol ya descrito para la DA.



El ensayo fluorimétrico se realizó según la técnica descrita por Welch y Welch (1.969), que nos permite detectar pequeñas cantidades de NA, superiores a 5 ng.

#### 5.4.3.1. MATERIAL

Tampón acetato 2M, pH = 6,8

Solución de Iodo 0,1 N. Una vez preparado fue mantenida a una temperatura de 6 - 7° C.

Tiosulfato sódico 0,1 N, guardado a una temperatura de 6 - 7° C.

Solución alcalina de ácido ascórbico-etilendiamina.

Estandar de NA (Bitartrato de NA) de 1 ug/ml

Agua destilada

Todos los reactivos y el agua destilada fueron guardados en frascos de vidrio provistos de tapones del mismo material ya que se observó que el plástico producía contaminantes fluorescentes.

#### 5.4.3.2. TECNICA

A los problemas se les añade tampón acetato pH =6,8 obteniendo éstos un pH final de 5. Se observó que el tampón acetato producía mayor fluorescencia que los tampones fosfato o los tampones fosfitos citratos. Welch observó también, comparando varios métodos, que el pH óptimo para la oxidación y desarrollo del fluoróforo de la NA era aproximadamente de 5. (Fig. 3).

La oxidación fue hecha con una solución de Iodo al pH descrito y se esperan unos 3 minutos. Pasado este tiempo, se para la reacción y se provoca el reordenamiento de la molécula mediante la adición de tiosulfato sódico, y la solución alcalina de ácido ascórbico/etilendiamina. El tiosulfato sódico actúa como agente reductor mientras que el ácido ascórbico va a actuar como agente protector o estabilizante

Efectos del pH y del tampón en el desarrollo de la fluorescencia de la NA

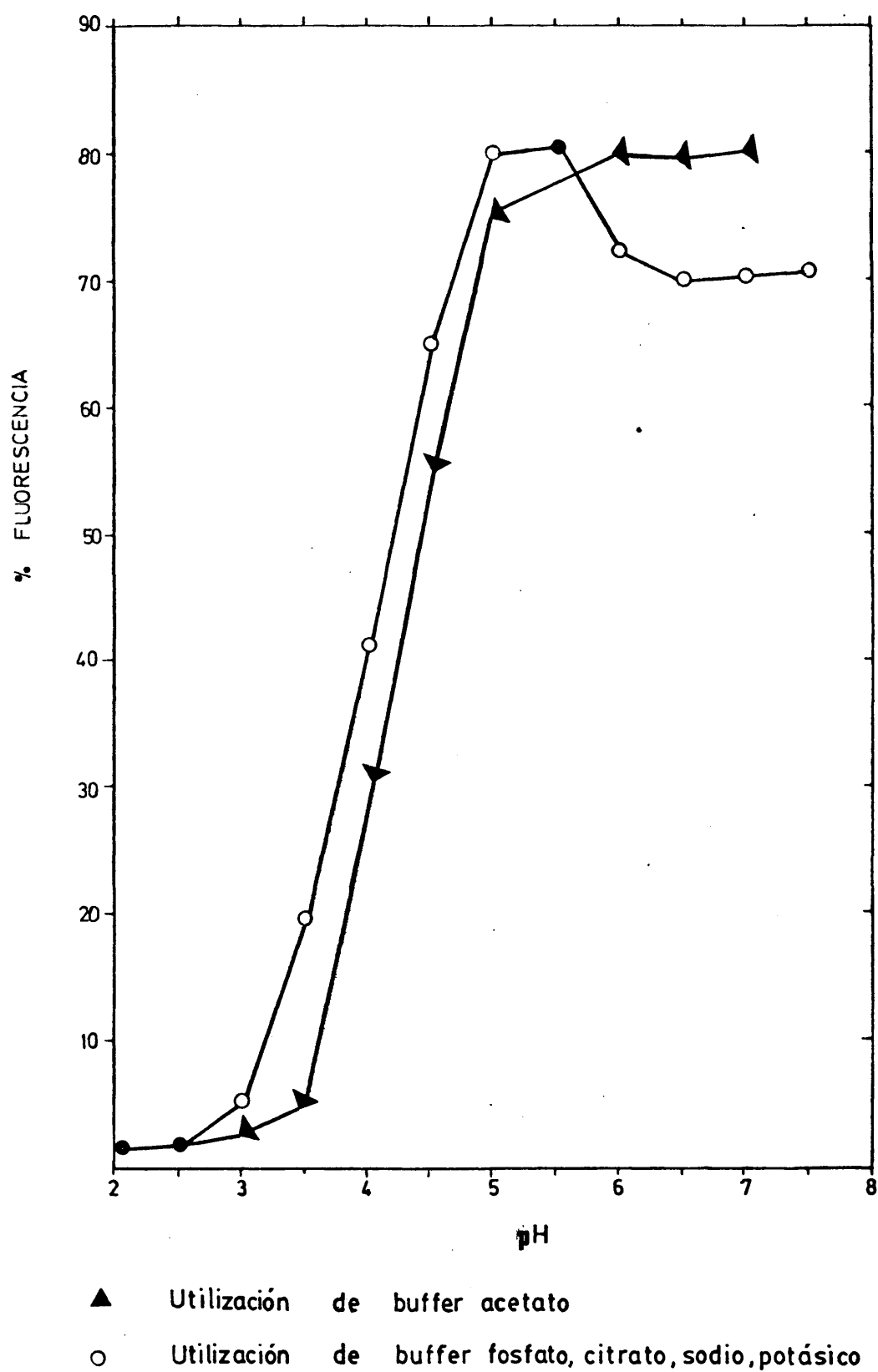


fig. 3

del compuesto fluorescente formado, ya que el exceso de iodo o el oxígeno disuelto en el tubo podrían oxidarlo, produciendo un compuesto no fluorescente.

La adición de etilendiamina a la mezcla NaOH/ácido ascórbico, baja y estabiliza el blanco, bien reduciendo o previniendo la oxidación del ácido ascórbico, que de otro modo ocurriría en la solución alcalina. Los blancos, por tanto, por este método fueron de fluorescencia claramente bajos, más que en aquellos métodos trihidroxiindol que utilizan para la tautomerización soluciones alcalino/ácido ascórbico.

El fluoróforo de NA, a diferencia del de DA, es destruido por el calor. Por ello, para terminar de desarrollar la fluorescencia, los tubos fueron irradiados con luz fluorescente, a una distancia del foco de 5 - 10 cm, siendo desarrollada la máxima fluorescencia alrededor de los 35 minutos.

Este fluoróforo fue estable durante 45 - 60 minutos después del máximo desarrollo. Normalmente la fluorescencia fue medida en el mismo momento en que se desarrolló, en un espectrofluorímetro, a una longitud de onda de excitación y emisión de 400 - 510 nm respectivamente.

En la cuantificación de NA se realizan los siguientes ensayos:

Estandares externos ( $ST_{ex}$ ) en los que se añaden todos los reactivos más 500 ng de NA. Sirven como referencia para la lectura espectrofluorimétrica.

Blancos de oxidación ( $B_{oxi}$ ) en los que se ensayan la fluorescencia de los reactivos disueltos en agua.

Tres tubos para cada muestra. Una oxidación por cada muestra (M) y aparte un estándar interno ( $ST_i$ )

en el que se oxida la muestra más 500 ng de NA, y un blanco de tejido ( $B_t$ ) en el que se impide la oxidación. Nos indica posibles interferencias procedentes del tejido.

El procedimiento detallado se indica en el protocolo adjunto.

PROTOCOLO PARA LA DETERMINACION FLUORIMETRICA DE NORADRENALINA

	B <sub>oxi</sub>	M	ST <sub>ex</sub>	B <sub>t</sub>
NA 1 ug/ml	-	-	0,5	-
Tampón acetato*	0,5	0,5	0,5	0,5
H <sub>2</sub> O	1	1	1	1
Iodo 0,1 N *	0,1	0,1	0,1	-
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>	-	-	-	0,15
Esperar de 3 - 4 minutos				
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> 0,1 N *	0,15	0,15	0,15	-
Iodo 0,1 N	-	-	-	0,1
Esperar de 3 - 4 minutos				
Solución alcali				
ácido ascórbico/	0,2	0,2	0,2	0,2
etilendiamina *				

Poner los tubos bajo luz fluorescente

Leer en menos de 40 minutos

Lectura a 400/510 nm

Volúmenes expresados en ml.

\* Agitar mecánicamente.

## 6. METODOS ESTADISTICOS

### a) Características muestrales

En todos los casos en que se obtuvieron medidas continuas como resultado de las observaciones, se utilizó la media como medida de centralidad y la desviación típica como medida de dispersión. Estos parámetros se calcularon con un computador digital. Sus fórmulas matemáticas son:

- Media aritmética

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{n} \quad \text{Siendo } n \text{ el nº de datos}$$

- La desviación típica se obtiene como la raíz cuadrada de la varianza

$$DT = \sqrt{V}$$

Siendo la varianza

$$V = \sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

En el caso de los diagramas de barras, la altura de cada barra representa la media. Sobre ella se dibuja el error típico de la media que se calcula como

$$e.s.m. = \frac{DT}{\sqrt{n}}$$

### b) Prueba t de Student

Para la comparación de muestras se utiliza la prueba t de Student. La aplicación de esta prueba es especialmente útil en el caso de comparar dos muestras de tamaño pequeño, cuando no se conoce la varianza de la población y por tanto tiene que ser estimada a partir de los datos de la muestra como

es nuestro caso. El método se basa en la comparación de la diferencia entre dos medias con la desviación típica de esa diferencia. Para obtener el valor de t, utilizamos la expresión siguiente para tamaños muestrales diferentes.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{V_1(n_1-1) + V_2(n_2-1)}{n_1 + n_2 - 2} \cdot \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}}}$$

$n_1$  y  $n_2$  son los tamaños muestrales de las dos muestras analizadas.

El nº de grados de libertad es  $n_1 + n_2 - 2$ .

El nivel mínimo de significación escogido fue el correspondiente al 5%. Es decir, que sólo se consideraban significativas las diferencias entre dos medias si el valor calculado de t correspondía a una probabilidad  $p < 0,05$ . Operando así, cuando decimos que existen diferencias significativas entre dos medias, la probabilidad de equivocarnos es menor del 5%.

### c) Análisis de varianza.

En los casos en que se querían comparar diferencias entre más de dos muestras correspondientes a una misma variable, medida con distintos tratamientos, ó en diferentes grupos, se utilizó el análisis de varianza. Este análisis presenta la ventaja de disminuir el volumen de trabajo, ya que utilizando pruebas t para comparar n medias dos a dos, habría que utilizar  $\binom{n}{2}$  pruebas t. Además se correría el riesgo en este caso de que dos de las muestras comparadas viniesen de los dos extremos de la distribución, con lo que se obtendrían resultados significativos en apariencia, cuando no lo serían en realidad.



- Análisis jerárquico simple desequilibrado

Este análisis de varianza se utiliza debido a que el número de observaciones era distinto. En este caso la fórmula tabular es:

Fuente de variación	g.l.	SC	MC
Externa	$I - 1$	$\sum_i \frac{x_{i.}^2}{J_i} - \frac{x^2}{T}$	$\frac{S C_E}{I - 1}$
Interna	$T - I$	$\sum_i \sum_j x_{ij}^2 - \sum_i \frac{x_{i.}^2}{J_i}$	$\frac{S C_I}{T - I}$

g.l. = grados de libertad

S.C. = Suma de cuadrados

M.C. = Media de cuadrados

$$x_{i.} = \sum_{j=1}^J x_{ij}$$

$$x_{..} = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J x_{ij}$$

El valor de F se obtiene como:

$$F = \frac{I-1}{T-I} \cdot \frac{MC_E}{MC_I}$$

Cuando este valor de F calculado resulta ser mayor que el que dan las tablas para el nivel de probabilidad deseado ( $p < 0,05$ ), hay diferencia significativa al menos en una de las medias.

d) Prueba de Scheffé.

Para calcular la significación entre las medias tomadas dos a dos, se utilizó el método de Scheffé, que utiliza los parámetros del análisis de varianza. Consiste en el cálculo

lo de la cantidad S.

$$S = \sqrt{\frac{I-1}{(I-1)F_{(T-I)}}} \cdot \text{D.T.} (\bar{x}_1 - \bar{x}_2)$$

Siendo  $\bar{x}_1$  y  $\bar{x}_2$  las dos medias que se comparan y

$$\text{D.T.} (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) = MC_I \left( \frac{1}{j_1} + \frac{1}{j_2} \right)$$

Si el valor de S calculado para una  $p < 0,05$  es menor que la diferencia entre las dos medias en valor absoluto  $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ , se acepta que existen diferencias significativas entre ambas.

En todas las tablas cuando se utilizan pruebas estadísticas el nº de asteriscos corresponde a las probabilidades de significación en la siguiente forma:

$$* = p < 0,05$$

$$** = p < 0,025$$

$$*** = p < 0,01$$

$$**** = p < 0,005$$

## RESULTADOS

## RESULTADOS

Hemos agrupado los resultados de la siguiente forma, considerando siempre por separado ambos sexos:

### A) Ratas Normales:

- a) Peso del cerebro a los 15,30,45 y 60 días de edad (Tabla I, Fig. 1).
- b) Peso del diencéfalo a los 15,30,45 y 60 días de edad (Tabla I).
- c) Proteínas totales del cerebro a los 15,30,45 y 60 días de edad (Tabla II, Fig. 2).
- d) Proteínas totales del diencéfalo a los 15,30,45 y 60 días de edad (Tabla II).
- e) Dopamina en cerebro total a los 15,30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\mu\text{g/g}$  de tejido (Tabla III, Fig.3).
- f) Dopamina en diencéfalo a los 15,30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\mu\text{g/g}$  de tejido (Tabla III, Fig. 3).
- g) Dopamina en diencéfalo a los 15,30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\text{ng/mg}$  proteína (Tabla IV, Fig.4).
- h) Dopamina en resto del cerebro a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\mu\text{g/g}$  tejido (Tabla III, Fig. 3).
- i) Dopamina en resto del cerebro a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\text{ng/mg}$  proteína (Tabla IV, Fig. 4)
- j) Noradrenalina en cerebro total a los 15,30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\mu\text{g/g}$  tejido (Tabla V, Fig.5).
- k) Noradrenalina en diencéfalo a los 15,30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\mu\text{g/g}$  tejido (Tabla V, Fig. 6).

- I) Noradrenalina en diencéfalo a los 15,30,45 y 60 días de edad, expresada en ng/mg proteína (Tabla VI, Fig. 6).
- m) Noradrenalina en resto del cerebro a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\mu\text{g/g}$  tejido (Tabla V., Fig.5).
- B) Ratas adrenalectomizadas a los 23 días de edad:
- a) Peso del cerebro a los 30,45 y 60 días de edad (Tabla VII Fig. 1).
- b) Peso del diencéfalo a los 30,45 y 60 días de edad (Tabla VII).
- c) Proteínas totales del cerebro a los 30,45 y 60 días de edad (Tabla VIII, Fig. 2).
- d) Proteínas totales del diencéfalo a los 30,45 y 60 días de edad, (Tabla VIII).
- e) Dopamina en diencéfalo a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\mu\text{g/g}$  tejido (Tabla IX, Fig. 7).
- f) Dopamina en diencéfalo a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en ng/mg proteína (Tabla X, Fig. 8).
- g) Dopamina en resto del cerebro a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\mu\text{g/g}$  tejido (Tabla IX, Fig. 7).
- h) Dopamina en resto del cerebro a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en ng/mg proteínas (Tabla X, Fig. 8).
- i) Noradrenalina en diencéfalo a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\mu\text{g/g}$  tejido (Tabla XI. Fig.9).
- j) Noradrenalina en diencéfalo a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en ng/mg tejido (Tabla XII, Fig. 10

- k) Noradrenalina en resto del cerebro a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\mu\text{g/g}$  tejido (Tabla XI, Fig.9).
- l) Noradrenalina en resto del cerebro a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\text{ng/mg}$  proteína (Tabla XII, Fig. 10).

C) Ratas tiroidectomizadas a los 23 días de edad:

- a) Peso del cerebro a los 30,45 y 60 días de edad (Tabla XIII, Fig. 1).
- b) Peso del diencéfalo a los 30,45 y 60 días de edad (Tabla XIII).
- c) Proteínas totales del cerebro a los 30,45 y 60 días de edad (Tabla XIV, Fig. 2).
- d) Proteínas totales del diencéfalo a los 30,45 y 60 días de edad (Tabla XIV).
- e) Dopamina en diencéfalo a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\mu\text{g/g}$  tejido (Tabla XV, Fig. 11).
- f) Dopamina en diencéfalo a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\text{ng/mg}$  proteína (Tabla XVI, Fig. 12).
- g) Dopamina en resto del cerebro a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\mu\text{g/g}$  tejido (Tabla XV, Fig. 11).
- h) Dopamina en resto del cerebro a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\text{ng/mg}$  proteína (Tabla XVI, Fig.12).
- i) Noradrenalina en diencéfalo a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\mu\text{g/g}$  tejido (Tabla XVII, Fig. 13).
- j) Noradrenalina en diencéfalo a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\text{ng/mg}$  proteína (Tabla XVIII, Fig. 14).
- k) Noradrenalina en resto del cerebro a los 30,45 y 60 días

de edad, expresada en  $\mu\text{g/g}$  tejido (Tabla XVII, Fig. 13).

- l) Noradrenalina en resto del cerebro a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\text{ng/mg}$  proteína (Tabla XVIII, Fig. 14).

D) Ratas gonadectomizadas a los 23 días de edad:

- a) Peso del cerebro a los 30, 45 y 60 días de edad (Tabla XIX, Fig. 1).
- B) Peso del diencéfalo a los 30,45 y 60 días de edad (Tabla XIX).
- c) Proteínas totales del cerebro a los 30,45 y 60 días de edad (Tabla XX, Fig. 2).
- d) Proteínas totales de diencéfalo a los 30,45 y 60 días de edad (Tabla XX).
- e) Dopamina en diencéfalo a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\mu\text{g/g}$  tejido (Tabla XXI, Fig. 15).
- f) Dopamina en diencéfalo a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\text{ng/mg}$  proteína (Tabla XXII, Fig. 16).
- g) Dopamina en resto del cerebro a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\mu\text{g/g}$  tejido (Tabla XXI, Fig. 15).
- h) Dopamina en resto del cerebro a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\text{ng/mg}$  proteína (Tabla XXII, Fig. 16).
- i) Noradrenalina en diencéfalo a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\mu\text{g/g}$  tejido (Tabla XXIII, Fig. 17).
- j) Noradrenalina en diencéfalo a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\text{ng/mg}$  proteína (Tabla XXIV, Fig. 18).
- k) Noradrenalina en resto del cerebro a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en  $\mu\text{g/g}$  tejido (Tabla XXIII, Fig. 17).

- 1) Noradrenalina en resto del cerebro a los 30,45 y 60 días de edad, expresada en ng/mg proteína (Tabla XXIV, Fig. 18).



Se observan los siguientes resultados:

A) Desarrollo del cerebro y riqueza de noradrenalina y dopamina entre los 15 y los 60 días de edad, en ratas normales.

1) El cerebro, que a los 15 días pesa algo más de 1 g, aumenta alrededor del 40% de su valor inicial en los 45 días siguientes. Dicho aumento no es homogéneo, sino que al principio es más acusado y va siendo progresivamente menor.

Simultáneamente aumenta el contenido en proteínas; pero la evolución de ambos parámetros no es paralela. Así, por ejemplo, entre los 30 y los 45 días de edad las proteínas del cerebro se mantienen prácticamente constantes, mientras que el peso del cerebro se incrementa en más de 0,1 g. En consecuencia, los mg de proteína por gramo de tejido cerebral varían según la edad del animal y oscilan entre 47 y 61 mg/g. Esto se refleja en la distinta forma de las gráficas representativas de las catecolaminas cerebrales según se representen en  $\mu\text{g/g}$  tejido o en ng/mg proteína.

Las diferencias de peso del cerebro y de contenido en proteínas entre machos y hembras no son estadísticamente significativas.

2) Las concentraciones de DA y NA en el cerebro total de la rata, a los 15 días de edad, son respectivamente, 0,31  $\mu\text{g/g}$  tejido y 0,16  $\mu\text{g/g}$  tejido y alcanzan los valores de 0,94 y 0,42 a los 60 días. Es decir, experimentan un incremento del 200% la DA y del 160% la NA. Este incremento es prácticamente continuo y regular en el caso de la dopamina durante el período considerado; pero no así en el caso de

la noradrenalina, que alcanza su valor máximo a los 45 días de edad y a partir de entonces queda prácticamente estabilizado, o incluso disminuye.

La región diencefálica es más rica en catecolaminas que el resto del cerebro y también es en ella en donde se observan los mayores incrementos de concentración durante este período (entre los 15 y los 60 días de edad). Por ejemplo, en el día 30, la concentración de DA en el cerebro total es de 0,45  $\mu\text{g/g}$ , en el diencéfalo era de 0,65 y en el resto del cerebro 0,32; las concentraciones correspondientes de NA fueron 0,28, 0,45 y 0,17  $\mu\text{g/g}$ . Entre los días 30 y 45, la concentración de DA aumentó el 47% en el diencéfalo y el 0% en el resto del cerebro; en este mismo período, la NA aumentó el 33% en el diencéfalo y se mantuvo también constante en el resto.

No hay diferencias significativas entre machos y hembras, por lo que, en lo sucesivo, consideraremos homogénea la población formada por todos los animales normales (controles) sin atender al sexo. Las curvas "C" de las figuras 7 a 18 corresponden, pues, a todas las ratas normales.

#### B) Catecolaminas cerebrales en ratas adrenaoprivas.

La adrenalectomía parece impedir que aumente la concentración de dopamina en cerebro, tanto en el diencéfalo como en el resto del tejido; siendo este efecto particularmente marcado en los machos. Cuando se expresan los resultados en ng de dopamina/mg de proteína, vemos que el aumento de DA en el diencéfalo de los machos es mucho menor que el experimentado por los controles; si bien en las hembras la evolución de la DA diencefálica no se aparta significa-

tivamente de la curva normal. En el resto del cerebro no se observa el discreto aumento de la DA entre los 45 y los 60 días de edad, ni en los machos ni en las hembras.

En cuanto a los niveles de NA en el cerebro de los animales adrenalectomizados, no se aprecian diferencias significativas con los controles, aunque es digno de destacar el hecho de que entre los 45 y los 60 días de edad la NA diencefálica sigue aumentando (Sobre todo en los machos: Figura 10) en vez de disminuir.

#### C) Catecolaminas cerebrales en ratas tiroprivas.

La extirpación del tiroides provoca alteraciones muy marcadas en el desarrollo de ambas catecolaminas en el diencéfalo y no afecta apenas a las contenidas en el resto del cerebro. Las concentraciones de DA en el diencéfalo se estabilizan en el nivel que tenían en el momento de la operación, o bien disminuyen. Lo mismo ocurre con la NA. La evolución del proceso parece distinta en los machos y en las hembras, siendo los machos los que más rápidamente son afectados por la operación, aunque a largo plazo las cifras más bajas se observan en las hembras.

Es notable -y conocido- el pobre desarrollo ponderal del cerebro de estos animales y el descenso de su contenido en proteínas, que llega a ser de sólo 40 mg/g a los 60 días de edad; es decir, 37 días después de la operación.

#### D<sub>1</sub>) Catecolaminas cerebrales en machos castrados

La DA del diencéfalo experimenta un fuerte aumento tras la operación, de forma que 7 días después su concentra-

ción es 1,33  $\mu\text{g/g}$  (23,3 ng/mg proteína), lo que representa el doble de las cifras normales en ratas de la misma edad. Posteriormente disminuye, y como en los animales normales la DA del diencéfalo sigue aumentando, sus valores a los 60 días son prácticamente iguales, aunque todavía es algo mayor la DA diencefálica de los machos orquidectomizados que la de los controles.

La DA del resto del cerebro, en cambio, no se aparta sensiblemente de la curva normal a lo largo del período comprendido entre los 30 y los 60 días de edad.

También la NA del diencéfalo aumenta después de la operación, pero de manera más discreta: a los 7 días es sólo un 23% superior a los controles. Pero, a diferencia de la DA, no disminuye a partir de este momento, sino que evoluciona paralelamente a los controles, aumentando entre los 30 y 45 días y disminuyendo entre los 45 y los 60 días. En este punto, la concentración de NA en el diencéfalo de los animales castrados es aún un 11% superior que la de las ratas normales.

Las concentraciones de NA en el resto del cerebro son prácticamente iguales que en los controles.

## D<sub>2</sub>) Catecolaminas cerebrales en hembras ovariectomizadas

La extirpación de los ovarios provoca también aumento de catecolaminas en el diencéfalo y no altera significativamente sus niveles en el resto del cerebro.

Las ratas ovariectomizadas tienen, a los 7 días de la operación, una concentración de DA en el diencéfalo el 70% superior a las normales, y la NA está aumentada en un

45%.

La evolución posterior de estos parámetros es distinta, si se compara con lo que ocurre en los machos orquidectomizados:

La DA del diencéfalo aumenta de manera continua entre los 30 y los 60 días, casi paralelamente a la de los controles, y sus concentraciones finales son el 37% superiores a las de estos.

También aumenta continuamente la NA diencefálica, sin experimentar la detención a los 45 días, que se observa en los animales normales, por lo que, a los 60 días de edad, su concentración en los animales operados es un 50% superior a la normal.

Edad (días)	:	15	30	45	60
Cerebro, ratas ♂	:	1,18 ± 0,05 (20)	1,45 ± 0,10 (39)	1,58 ± 0,10 (24)	1,68 ± 0,10 (33)
Cerebro, ratas ♀	:	1,12 ± 0,07 (14)	1,39 ± 0,11 (29)	1,52 ± 0,07 (24)	1,59 ± 0,09 (41)
Diencefalo, ratas ♂	:	0,22 ± 0,01 (7)	0,24 ± 0,05 (10)	0,30 ± 0,03 (7)	0,35 ± 0,03 (11)
Diencefalo, ratas ♀	:	0,22 ± 0,01 (8)	0,22 ± 0,03 (8)	0,31 ± 0,02 (6)	0,35 ± 0,03 (11)

TABLA I.- Ratas normales. Pesos del cerebro total y del diencefalo, en gramos.  $M \pm \sigma$   
 (Las cifras entre parentesis indican el número de animales correspondientes  
 a cada grupo).

Edad (días)	:	15	30	45	60
Cerebro, ratas ♂	:	66,0 ± 6,4 (9)	75,1 ± 9,7 (8)	74,0 ± 2,1 (7)	83,3 ± 4,8 (6)
Cerebro, ratas ♀	:	69,0 ± 1,2 (10)	77,7 ± 3,2 (8)	78,1 ± 7,7 (9)	88,4 ± 10,9 (9)
Diencéfalo, ratas ♂	:	9,2 ± 2,1 (6)	14,1 ± 7,4 (6)	14,1 ± 1,7 (8)	17,0 ± 2,3 (5)
Diencéfalo, ratas ♀	:	9,8 ± 1,8 (8)	11,9 ± 2,6 (6)	12,8 ± 1,9 (8)	16,3 ± 2,9 (8)

TABLA II.- Ratas normales. Proteínas totales del cerebro y del diencéfalo, en mg. M ± σ

Edad (días) : 15 30 45 60

Cerebro, ratas ♂ :  $0,32 \pm 0,02$  (8).....  $0,46 \pm 0,03$  (8).....  $0,62 \pm 0,01$  (8).....  $0,94 \pm 0,03$  (7).....

Cerebro, ratas ♀ :  $0,31 \pm 0,02$  (7).....  $0,45 \pm 0,03$  (10).....  $0,63 \pm 0,03$  (8).....  $0,93 \pm 0,03$  (6).....

Diencéfalo, ratas ♂ :  $0,51 \pm 0,01$  (7).....  $0,67 \pm 0,01$  (6).....  $0,93 \pm 0,02$  (6).....  $1,16 \pm 0,08$  (6).....

Diencéfalo, ratas ♀ :  $0,50 \pm 0,01$  (7).....  $0,62 \pm 0,10$  (6).....  $0,96 \pm 0,01$  (6).....  $1,11 \pm 0,08$  (7).....

Resto cerebro, ratas ♂ : —  $0,34 \pm 0,01$  (8)  $0,34 \pm 0,02$  (8)  $0,35 \pm 0,01$  (7)

Resto cerebro, ratas ♀ : —  $0,31 \pm 0,02$  (10)  $0,29 \pm 0,01$  (8)  $0,44 \pm 0,02$  (6)

TABLA III.- Ratas normales. Dopamina en cerebro total, en diencéfalo y en resto del cerebro, en  $\mu\text{g/g.tejido}$ .  $M \pm \sigma$  . Los asteriscos en horizontal representan las diferencias significativas halladas por el análisis de varianza entre los distintos valores.



Edad (días)	:	30	45	60
Diencéfalo, ratas ♂	:	11,63 ± 1,75 ****	16,69 ± 0,71 ****	18,09 ± 1,61 ****
Diencéfalo, ratas ♀	:	11,40 ± 0,01****	16,24 ± 0,21****	18,06 ± 1,31****
Resto cerebro, ratas ♂	:	5,95 ± 0,45	6,74 ± 0,04	7,49 ± 1,31
Resto cerebro, ratas ♀	:	4,89 ± 0,32	5,42 ± 0,22	7,85 ± 0,49

- 130 -

TABLA IV.- Ratas normales. Dopamina en diencéfalo y en resto del cerebro, en ng/mg proteína.

M ± .σ. Los asteriscos en la línea horizontal representan las diferencias significativas halladas por el análisis de varianza entre los distintos valores.

Edad (días)	:	15	30	45	60
Cerebro, ratas ♂	:	$0,16 \pm 0,03$ (7).....	$0,28 \pm 0,03$ (8).....	$0,41 \pm 0,02$ (9)	$0,42 \pm 0,02$ (7).....
Cerebro, ratas ♀	:	$0,16 \pm 0,02$ (7).....	$0,28 \pm 0,01$ (11).....	$0,41 \pm 0,01$ (10)	$0,41 \pm 0,01$ (7).....
Diencéfalo, ratas ♂	:	$0,26 \pm 0,03$ (7).....	$0,47 \pm 0,02$ (4).....	$0,60 \pm 0,01$ (6)	$0,57 \pm 0,06$ (7).....
Diencéfalo, ratas ♀	—	$0,26 \pm 0,01$ (6).....	$0,41 \pm 0,01$ (5).....	$0,60 \pm 0,07$ (5)	$0,56 \pm 0,06$ (7).....
Resto cerebro, ratas ♂	:	—	$0,16 \pm 0,01$ (8)	$0,16 \pm 0,01$ (8)	$0,21 \pm 0,03$ (5)
Resto cerebro, ratas ♀	:	—	$0,19 \pm 0,03$ (7)	$0,19 \pm 0,01$ (9)	$0,23 \pm 0,05$ (10)

TABLA V.- Ratatas normales. Noradrenalina en cerebro total, en diencéfalo y en resto del cerebro, en  $\mu\text{g/g}$ . tejido.  $M \pm \sigma$ . Los asteriscos en horizontal representan las diferencias significativas halladas por el análisis de varianza entre los distintos valores.

Edad (días)	:	30	45	60
Diencéfalo, ratas ♂	:	8,32 ± 0,75***	9,71 ± 0,52	9,32 ± 1,43 ***
Diencéfalo, ratas ♀	:	7,82 ± 0,57****	9,61 ± 0,71	9,55 ± 0,58****
Resto cerebro, ratas ♂	:	2,69 ± 0,18	3,60 ± 0,80	3,81 ± 0,02
Resto cerebro, ratas ♀	:	2,85 ± 0,48	3,07 ± 0,20	3,72 ± 0,31

- 132 -

TABLA VI.- Ratas normales. Noradrenalina en diencéfalo y en resto del cerebro, en ng/mg protéínas.  $M \pm \sigma$ . Los asteriscos en la línea horizontal representan las diferencias significativas halladas por el análisis de varianza entre los distintos valores.

Edad (días)	:	30	45	60
Cerebro, ratas ♂	:	1,51 ± 0,05 (9)	1,67 ± 0,20 (5)	1,74 ± 0,08 (5)
Cerebro, ratas ♀	:	1,40 ± 0,04 (9)	1,71 ± 0,06 (5)	1,79 ± 0,05 (5)
Diencéfalo, ratas ♂	:	0,18 ± 0,02 (9)	0,23 ± 0,03 (4)	0,25 ± 0,01 (5)
Diencéfalo, ratas ♀	:	0,16 ± 0,04 (8)	0,18 ± 0,04 (5)	0,27 ± 0,01 (5)

- 133 -

TABLA VII.- Ratas adrenalectomizadas. Peso del cerebro total y del diencéfalo, en gramos. M ± σ

Edad (días)	:	30	45	60
Cerebro, ratas ♂	:	79,1 ± 1,2	76,2 ± 3,2	90,0 ± 4,2
Cerebro, ratas ♀	:	83,9 ± 2,6	87,0 ± 2,9	93,4 ± 2,4
Diencéfalo, ratas ♂	:	11,9 ± 3,2	13,1 ± 1,7	13,2 ± 0,7
Diencéfalo, ratas ♀	:	10,1 ± 2,2	11,8 ± 1,8	13,7 ± 1,1

TABLA VIII.- Ratas adrenalectomizadas. Proteínas totales del cerebro y del diencéfalo, en mg.  
M ± σ

Edad (días)	:	30	45	60
Diencefalo, ratas ♂	:	0,73 ± 0,08 (6)	0,80 ± 0,07 (3) ****	0,79 ± 0,08 (4) ****
Diencefalo, ratas ♀	:	0,66 ± 0,11 (6)	0,90 ± 0,02 (3) ****	0,90 ± 0,04 (5) ****
Resto del cerebro, ratas ♂	:	0,35 ± 0,06 (7) **	0,29 ± 0,04 (4) ****	0,27 ± 0,07 (4) *
Resto del cerebro, ratas ♀	:	0,29 ± 0,32 (8)	0,30 ± 0,03 (5)	0,30 ± 0,06 (4) ****

- 135 -

TABLA IX. - Ratas adrenalectomizadas. Dopamina en diencefalo y en resto del cerebro, en µg/g. tejido.  $M \pm \sigma$ . Los asteriscos en la línea vertical, indican el grado de significación entre estos datos y los controles de la Tabla III. Los asteriscos en la línea horizontal representan las diferencias significativas halladas por el análisis de varianza entre los distintos valores.

Edad (días)	:	30	45	60
Diencéfalo, ratas ♂	:	12,75 $\pm$ 1,32	14,82 $\pm$ 0,32 ***	15,36 $\pm$ 1,42 **
Diencéfalo, ratas ♀	:	12,24 $\pm$ 0,94 *	17,05 $\pm$ 0,32 ***	17,95 $\pm$ 1,40**
Resto del cerebro, ratas ♂	:	5,50 $\pm$ 0,63	5,52 $\pm$ 0,05 ***	5,94 $\pm$ 1,10 *
Resto del cerebro, ratas ♀	:	5,36 $\pm$ 0,92	6,23 $\pm$ 0,82 *	5,95 $\pm$ 0,95 ***

TABLA X.- Ratat adrenalectomizadas. Dopamina en diencéfalo y en resto del cerebro, en ng/mg proteína. M  $\pm$  S. Los asteriscos en la línea vertical, indican el grado de significación entre estos datos y los controles de la Tabla IV. Los asteriscos en la línea horizontal representan las diferencias significativas halladas por el análisis de varianza entre los distintos valores.

Edad (días)

:

45

60

Diencéfalo, ratas ♂

: 0,48 ± 0,08 (9)

0,58 ± 0,01 (3)

0,62 ± 0,03 (4)

Diencéfalo, ratas ♀

: 0,45 ± 0,08 (7)

0,58 ± 0,08 (5)

0,61 ± 0,11 (4)

Resto del cerebro, ratas ♂

: 0,15 ± 0,02 (8)

0,16 ± 0,02 (3)

0,26 ± 0,01 ( )

Resto del cerebro, ratas ♀

: 0,14 ± 0,02 (8)

0,16 ± 0,01 (4)\*\*\*

0,21 ± 0,03 (4)\*\*\*

TABLA XI.- Ratas adrenalectomizadas. Noradrenalina en diencéfalo y en resto del cerebro, en

µg/g. tejido. M ± σ. Los asteriscos en la línea vertical, indican el grado de significación entre estos datos y los controles de la Tabla V. Los asteriscos en horizontal representan las diferencias significativas halladas por el análisis de

varianza entre los distintos valores.



Edad (días)	:	30	45	60
Diencefalo, ratas ♂	:	8,99 ± 1,68	9,83 ± 0,32	10,90 ± 0,74
Diencefalo, ratas ♀	:	8,00 ± 1,16	9,61 ± 0,44	9,69 ± 0,44
Resto del cerebro, ratas ♂	:	2,64 ± 0,52	3,13 ± 0,32	3,65 ± 0,23
Resto del cerebro, ratas ♀	:	3,40 ± 0,52	3,61 ± 0,16 ****	4,20 ± 0,10***

TABLA XII.- Ratas adrenalectomizadas. Noradrenalina en diencefalo y en resto del cerebro, en ng/mg proteína.  $M \pm \sigma$ . Los asteriscos en la línea vertical indican el grado de significación entre estos datos y los controles de la Tabla VI. Los asteriscos en la línea horizontal representan las diferencias significativas halladas por el análisis de varianza entre los distintos valores.

Edad (días)	:	30	45	60
Diencéfalo, ratas ♂	:	0,56 $\pm$ 0,08 $\pm$ * <sub>**</sub> (6)	0,76 $\pm$ 0,12 $\pm$ * <sub>**</sub> (4)	0,68 $\pm$ 0,04 $\pm$ * <sub>**</sub> (7)
Diencéfalo, ratas ♀	:	0,64 $\pm$ 0,07 $\pm$ * <sub>**</sub> (6)	0,70 $\pm$ 0,05 $\pm$ * <sub>**</sub> (5)	0,73 $\pm$ 0,06 $\pm$ * <sub>**</sub> (7)
Resto del cerebro, ratas ♂	:	0,16 $\pm$ 0,02 (7)	0,19 $\pm$ 0,02 (4)	0,18 $\pm$ 0,02 (10)
Resto del cerebro, ratas ♀	:	0,17 $\pm$ 0,02 (5)	0,20 $\pm$ 0,01 (6)	0,24 $\pm$ 0,04 (11) <sup>3</sup>

TABLA XXIII..- Ratas gonadectomizadas. Noradrenalina en diencéfalo y en resto del cerebro, en  $\mu\text{g/g}$  tejido.  $M \pm \sigma$ . Los asteriscos en la línea vertical indican el grado de significación entre estos datos y los controles de la Tabla V.

Edad (días)	:	30	45	60
Cerebro, ratas ♂	:	85,4 ± 6,0	73,5 ± 4,0	63,0 ± 3,4
Cerebro, ratas ♀	:	90,1 ± 2,6	77,4 ± 8,8	66,0 ± 5,8
Diencéfalo, ratas ♂	:	11,1 ± 1,6	14,1 ± 0,9	17,4 ± 1,0
Diencéfalo, ratas ♀	:	11,7 ± 1,8	12,2 ± 1,3	15,6 ± 1,5

- 140 -

TABLA XIV.- Ratas tiroidectomizadas. Proteínas totales del cerebro y del diencéfalo, en mg.  
M ± G

Edad (días)	:	30	45	60
Diencéfalo, ratas ♂	:	0,66 ± 0,06 (5)	0,66 ± 0,10 (4) ***	0,69 ± 0,05 (5) ***
Diencéfalo, ratas ♀	:	0,69 ± 0,02 (4)	0,75 ± 0,08 (5) ***	0,63 ± 0,03 (6) ***
Resto del cerebro, ratas ♂	:	0,43 ± 0,04 (6) **	0,37 ± 0,08 (5)	0,36 ± 0,05 (5)
Resto del cerebro, ratas ♀	:	0,34 ± 0,05 (6)	0,31 ± 0,04 (5)	0,48 ± 0,07 (4)

TABLA XV.- Ratas tiroidectomizadas. Dopamina en diencéfalo y en resto del cerebro, en µg/g tejido. M ± σ. Los asteriscos indican el grado de significación de las diferencias entre estos datos y los controles de la Tabla III.

Edad (días)	:	30	45	60
Diencéfalo, ratas ♂	:	12,38 ± 0,73	10,47 ± 2,71 ***	10,79 ± 0,59 ***
Diencéfalo, ratas ♀	:	12,66 ± 1,08	12,55 ± 1,06 ***	9,44 ± 0,58 *** *
Resto del cerebro, ratas ♂	:	6,71 ± 0,40 **	7,13 ± 0,36	7,25 ± 0,49 142
Resto del cerebro, ratas ♀	:	5,45 ± 0,76	5,84 ± 1,10	8,09 ± 0,14

TABLA XVI..- Ratas tiroidectomizadas. Dopamina en diencéfalo y en resto del cerebro, en ng/mg proteína. M ± S. Los asteriscos en la línea vertical, indican el grado de significación entre estos datos y los controles de la Tabla IV. Los asteriscos en la línea horizontal representan las diferencias significativas halladas por el análisis de varianza entre los distintos valores.

Edad (días)	:	30	45	60
Diencéfalo, ratas ♂	:	0,48 ± 0,02 (5)	0,51 ± 0,04* ***	0,49 ± 0,01* ***
Diencéfalo, ratas ♀	:	0,44 ± 0,05 (4)	0,43 ± 0,04* ***	0,44 ± 0,01* ***
Resto del cerebro, ratas ♂	:	0,19 ± 0,02* **	0,13 ± 0,02* *	0,21 ± 0,01 (4)
Resto del cerebro, ratas ♀	:	0,18 ± 0,01 (5)	0,16 ± 0,01* **	0,22 ± 0,02 (4)

TABLA XVII.- Ratas tiroidectomizadas. Noradrenalina en diencéfalo y en resto del cerebro, en  $\mu\text{g/g}$  tejido.  $M \pm \sigma$ . Los asteriscos en la línea vertical indican el grado de significación entre estos datos y los controles de la Tabla V. Los asteriscos en horizontal representan las diferencias significativas halladas por el análisis de varianza entre los distintos valores.

Edad (días)	:	30	45	60
Diencéfalo, ratas ♂	:	8,71 ± 0,81	8,16 ± 1,27 *	7,19 ± 0,32 ***
Diencéfalo, ratas ♀	:	8,04 ± 0,39	8,74 ± 0,04 ***	8,32 ± 0,93 *
Resto del cerebro, ratas ♂	:	3,17 ± 0,29	2,82 ± 0,39 ***	3,76 ± 0,16 ***
Resto del cerebro, ratas ♀	:	2,25 ± 0,17	2,53 ± 0,40 ***	3,66 ± 0,18 ***

TABLA XVIII.- Ratatas tiroidectomizadas. Noradrenalina en diencéfalo y en resto del cerebro, en ng/mg proteína. M ± D. Los asteriscos en la línea vertical indican el grado de significación entre estos datos y los controles de la Tabla VI.

Edad (días)	:	30	45	60
Cerebro, ratas ♂	:	77,24 ± 3,2	90,9 ± 3,4	87,0 ± 3,7
Cerebro, ratas ♀	:	83,8 ± 6,6	89,9 ± 1,6	90,2 ± 5,0
Diencéfalo, ratas ♂	:	11,8 ± 1,9	13,3 ± 2,3	19,4 ± 3,8
Diencéfalo, ratas ♀	:	11,4 ± 2,1	14,9 ± 2,2	21,5 ± 13,5

TABLA XX.- Ratas gonadectomizadas. Proteínas totales del cerebro y del diencéfalo, en mg.  
M ± σ



Edad (días)	:	30	45	60
Cerebro, ratas ♂	:	1,48 ± 0,07 (7)	1,63 ± 0,07 (6)	1,70 ± 0,07 (11)
Cerebro, ratas ♀	:	1,40 ± 0,07 (8)	1,63 ± 0,12 (7)	1,71 ± 0,09 (7)
Diencéfalo, ratas ♂	:	0,22 ± 0,03 (8)	0,26 ± 0,04 (6)	0,30 ± 0,06 (7)
Diencéfalo, ratas ♀	:	0,25 ± 0,03 (6)	0,29 ± 0,02 (6)	0,29 ± 0,10 (7)

- 146 -

TABLA XIX.- Ratas gonádoectomizadas. Pesos del cerebro total y del diencéfalo, en gramos M ± σ

Edad (días)	:	30	45	60
Diencéfalo, ratas ♂	:	1,33 $\pm$ 0,09 (8) ***	1,29 $\pm$ 0,09 (4) ***	1,22 $\pm$ 0,19 (7)
Diencéfalo, ratas ♀	:	1,14 $\pm$ 0,04 (5) ***	1,30 $\pm$ 0,22 (5) ***	1,50 $\pm$ 0,19 (7) **
Resto del cerebro, ratas ♂	:	0,36 $\pm$ 0,05 (7)	0,33 $\pm$ 0,02 (4)	0,33 $\pm$ 0,05 (11)
Resto del cerebro, ratas ♀	:	0,36 $\pm$ 0,05 (7) **	0,30 $\pm$ 0,02 (5)	0,40 $\pm$ 0,08 (7)

TABLA XXI..- Ratas gonadectomizadas. Dopamina en diencéfalo y en resto del cerebro, en  $\mu\text{g/g}$  tejido.  $M \pm \sigma$ . Los asteriscos indican el grado de significación de las diferencias entre estos datos y los controles de la Tabla III.

Edad (días)	:	30	45	60
Diencéfalo, ratas ♂	:	23,28 ± 2,62 ***	20,06 ± 0,24 ***	19,59 ± 3,30
Diencéfalo, ratas ♀	:	21,88 ± 3,40 ***	22,75 ± 2,20 ***	24,41 ± 2,10 ***
Resto del cerebro, ratas ♂	:	5,65 ± 0,95	6,95 ± 0,28	6,93 ± 1,07
Resto del cerebro, ratas ♀	:	5,91 ± 0,68 **	6,01 ± 0,89	7,23 ± 1,15

TABLA XXII.- Ratat gonadectomizadas. Dopamina en diencéfalo y en resto del cerebro, en ng/mg proteína. M ± σ. Los asteriscos en la línea vertical indican el grado de significación entre estos datos y los controles de la Tabla IV

Edad (días) : 30 45 60

Cerebro, ratas ♂ : 1,55 ± 0,06 (6) 1,55 ± 0,08 (5) 1,60 ± 0,06 (6)

Cerebro, ratas ♀ : 1,51 ± 0,03 (6) 1,51 ± 0,18 (5) 1,55 ± 0,13 (6)

Diencéfalo, ratas ♂ : 0,17 ± 0,02 (5) 0,24 ± 0,01 (5) 0,26 ± 0,01 (5) 149

Diencéfalo, ratas ♀ : 0,20 ± 0,04 (5) 0,25 ± 0,04 (5) 0,24 ± 0,02 (6)

TABLA XIII..- Ratas tiroidectomizadas. Pesos del cerebro total y del diencéfalo, en gramos. M ± σ

Edad (días)	:	30	45	60
Diencéfalo, ratas ♂	:	10,03 $\pm$ 1,47 *	12,04 $\pm$ 1,98 *	10,03 $\pm$ 0,37
Diencéfalo, ratas ♀	:	9,39 $\pm$ 1,09 ** *	10,31 $\pm$ 0,27 ** *	11,13 $\pm$ 1,31 ** *
Resto del cerebro, ratas ♂	:	2,34 $\pm$ 0,43 *	3,60 $\pm$ 0,48 *	3,51 $\pm$ 0,40 ** *
Resto del cerebro, ratas ♀	:	2,75 $\pm$ 0,36	2,96 $\pm$ 0,38	3,85 $\pm$ 0,53 ** *

TABLA XXIV.- Ratas gonadectomizadas. Noradrenalina en diencéfalo y en resto del cerebro, en ng/mg proteína.  $M \pm \sigma$ . Los asteriscos en la línea vertical, indican el grado de significación entre estos datos y los controles de la Tabla VI. Los asteriscos en la línea horizontal representan las diferencias significativas halladas por el análisis de varianza entre los distintos valores.

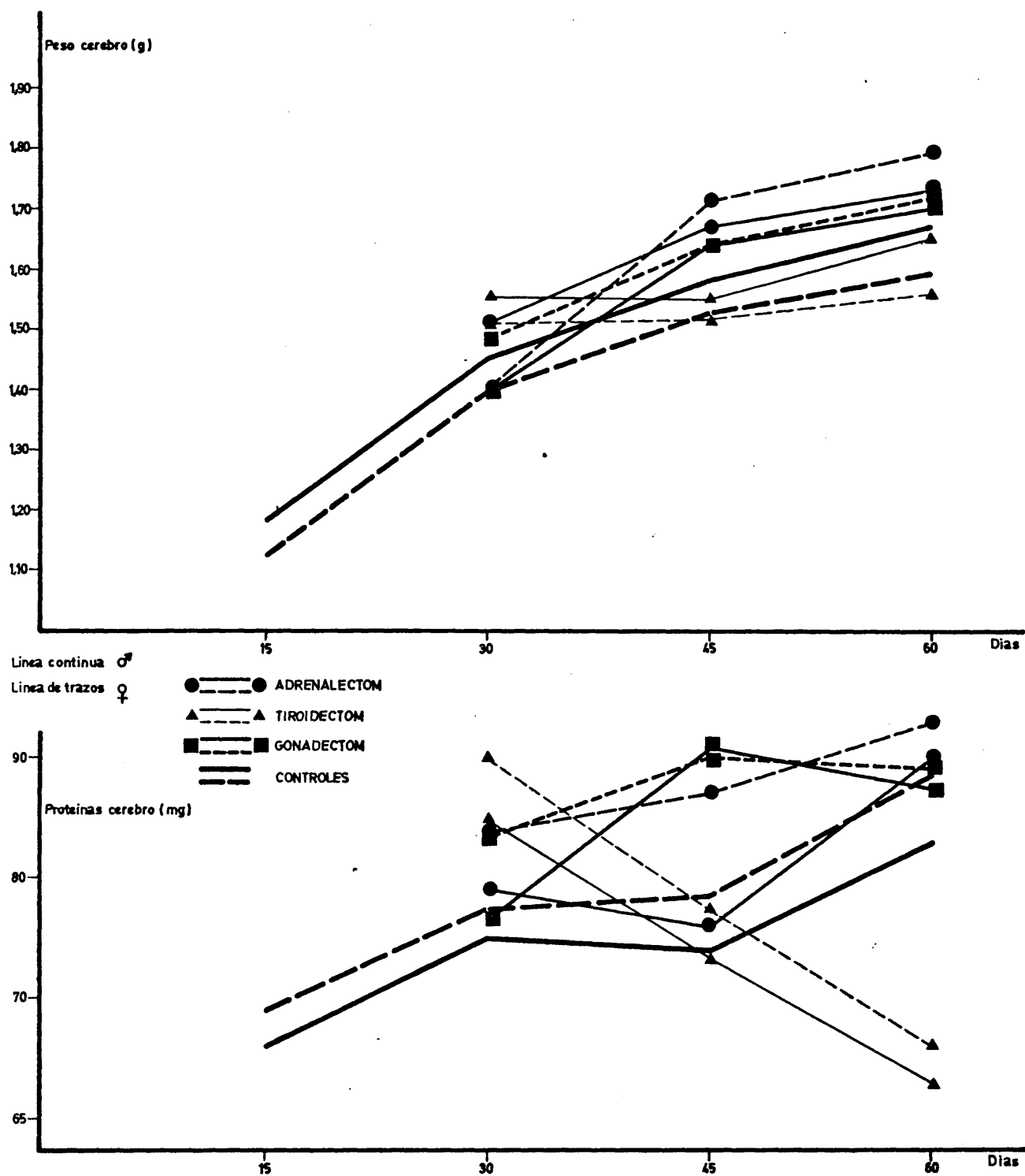


Fig. 1.- Peso del cerebro de ratas, machos y hembras, normales, adrenalectomizados, tiroidectomizados y gonadectomizados, durante los 60 días de vida postnatal.

Fig. 2.- Riqueza en proteínas del cerebro de las ratas en las condiciones expresadas en la Fig. 1.

## CONTROLES

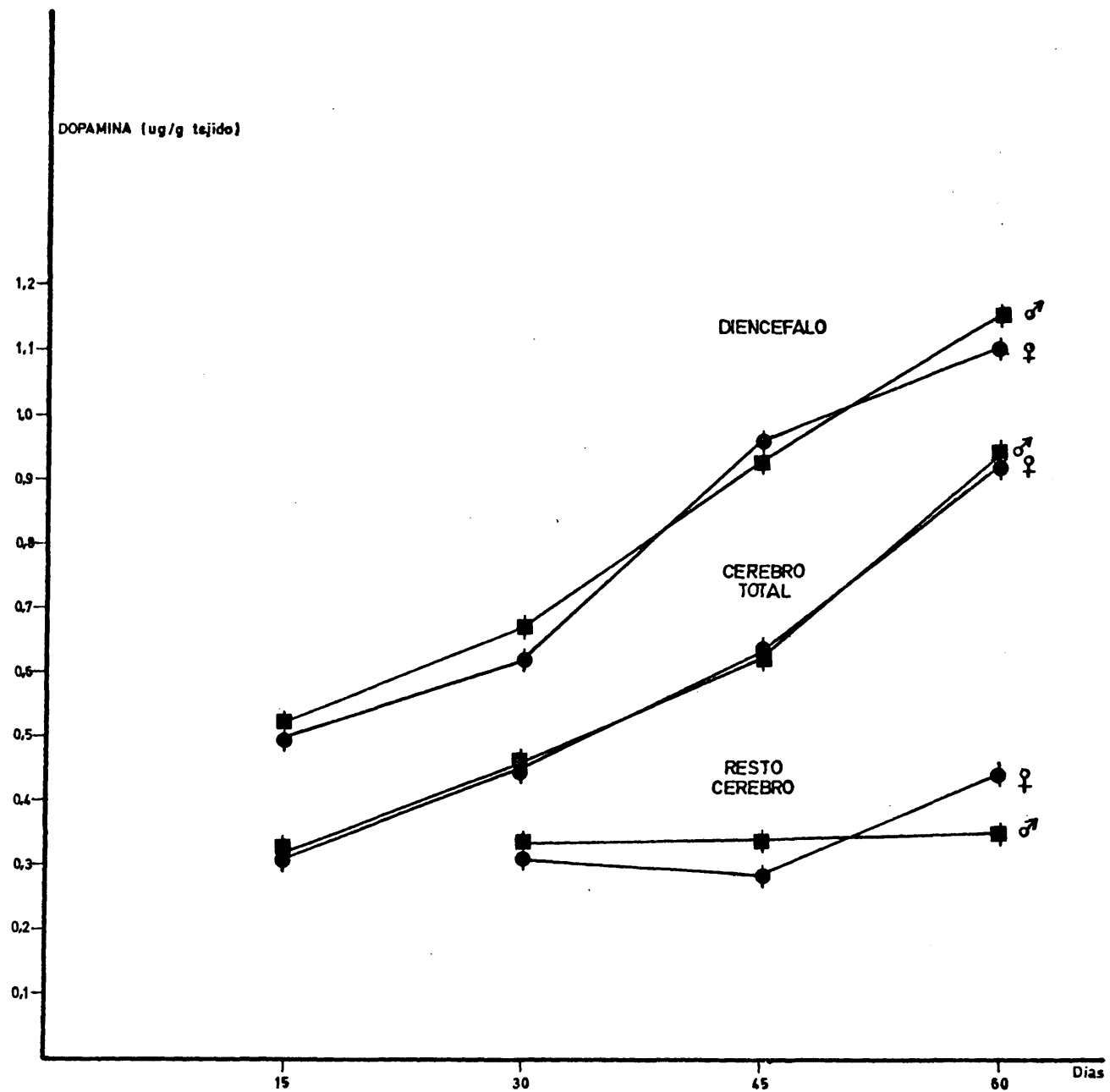


Fig.3. - Concentración de dopamina (DA) (ug/g tejido) en el cerebro total, en el diencéfalo y en el resto del cerebro de las ratas control (M ± S.E.)

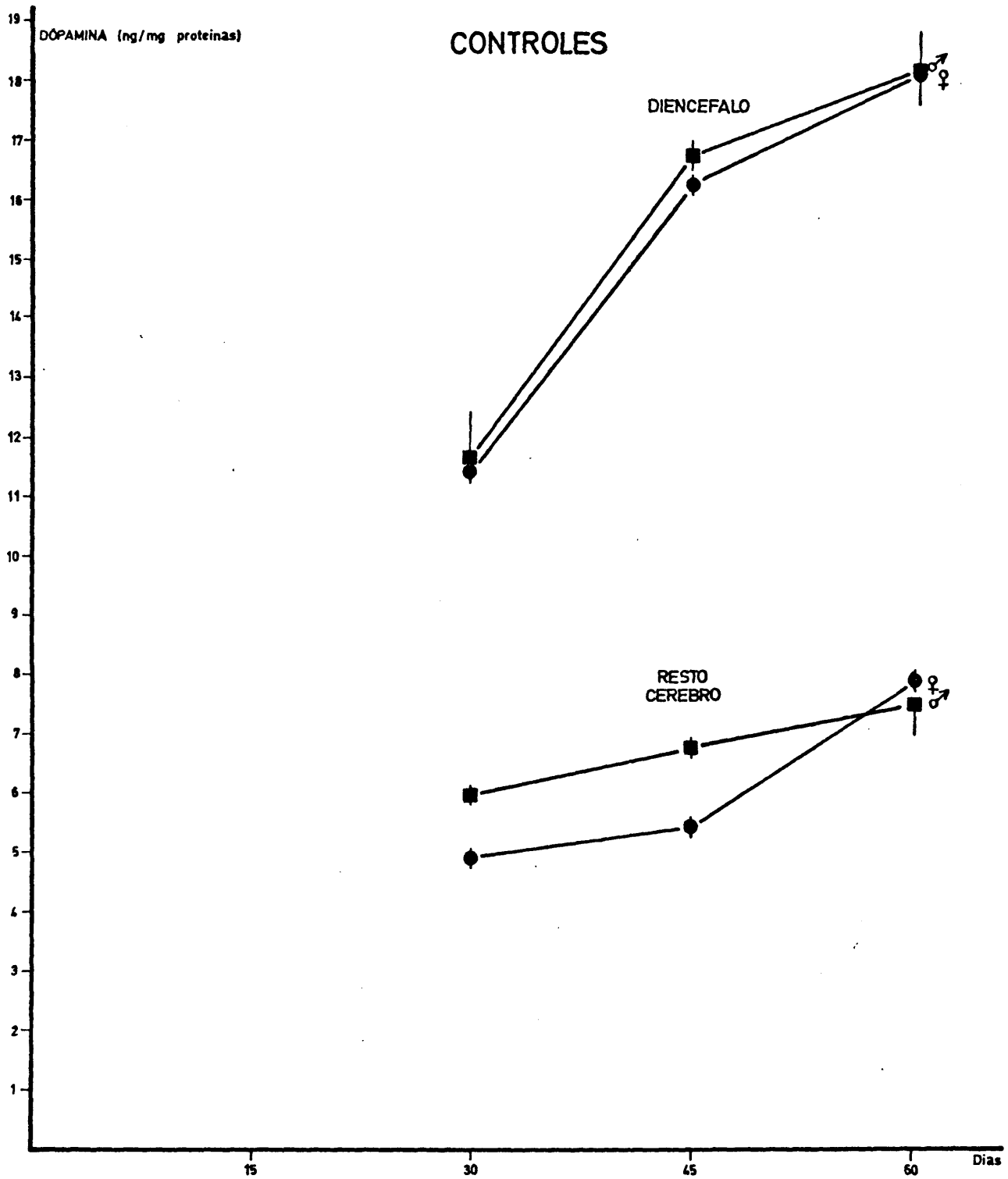


Fig.4.- Concentración de DA (ng/mg proteína) en el diencéfalo y en el resto del cerebro de las ratas controles ( $M \pm S.E.$ )



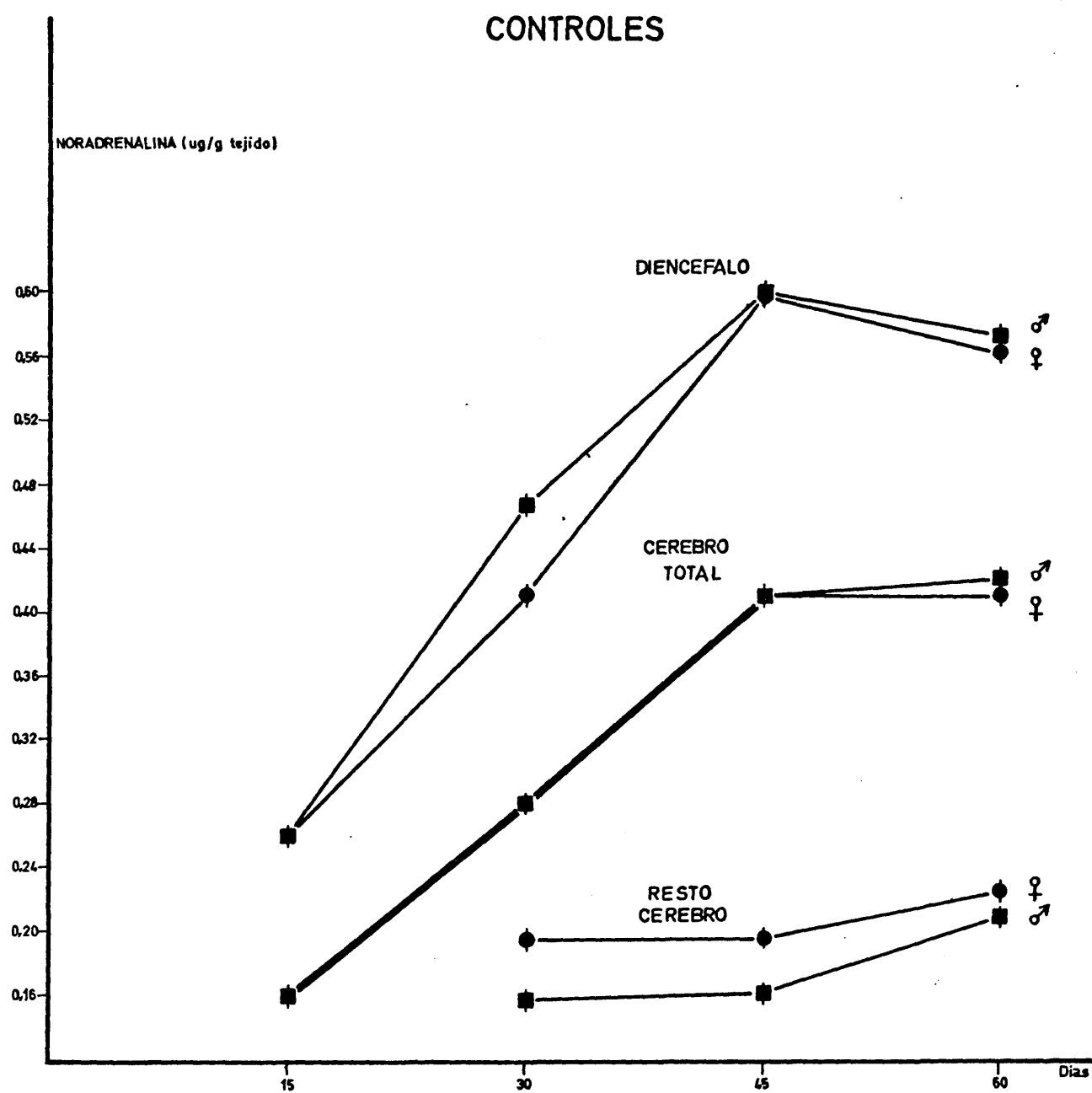


Fig.5.- Concentración de noradrenalina (NA) (ug/g tejido) en el cerebro total, en el diencéfalo y en el resto del cerebro de las ratas controles ( $M \pm S.E.$ )

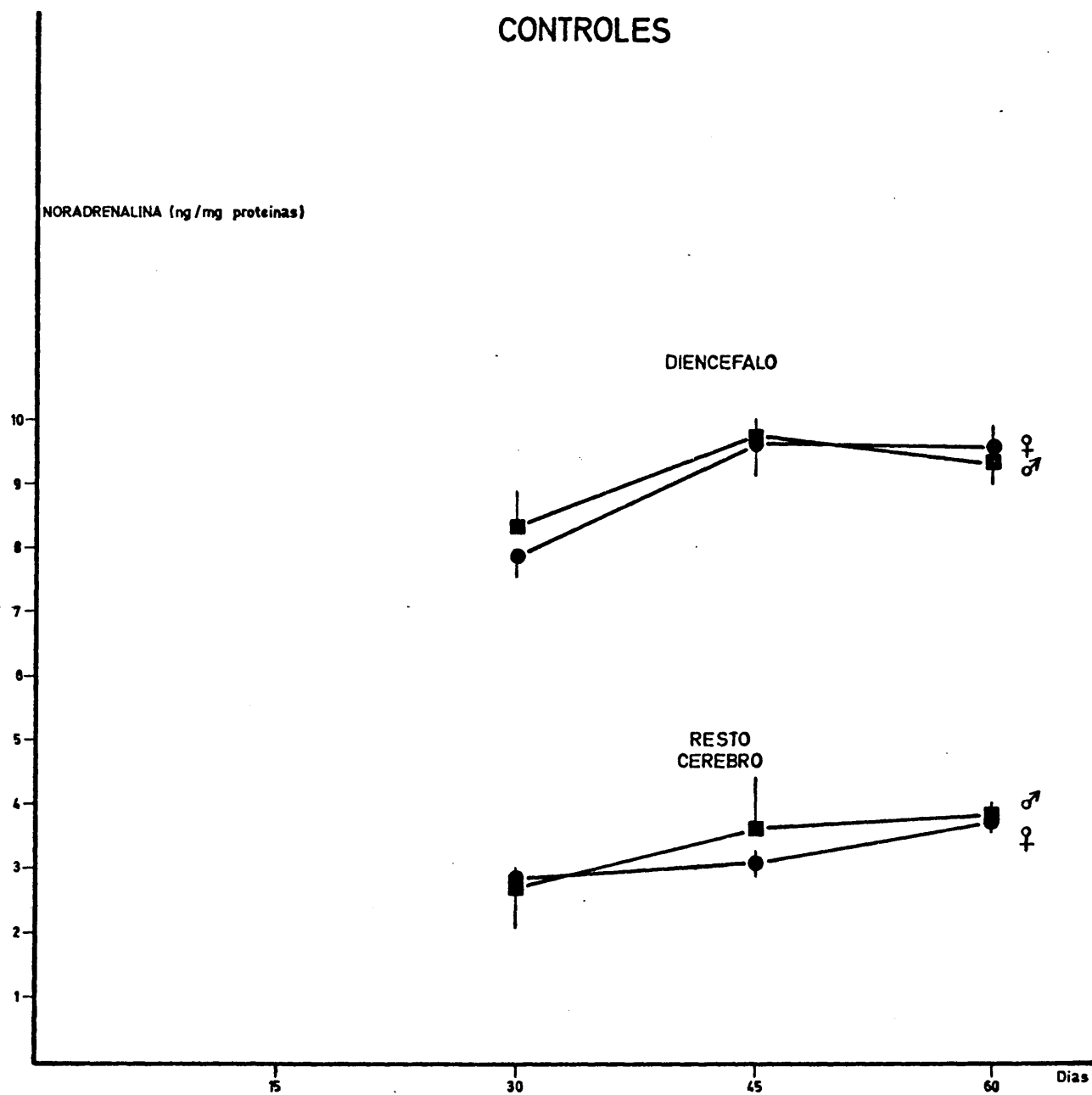


Fig.6.- Concentración de NA (ng/mg proteína) en el diencéfalo y en el resto del cerebro de las ratas controles ( $M \pm S.E.$ )

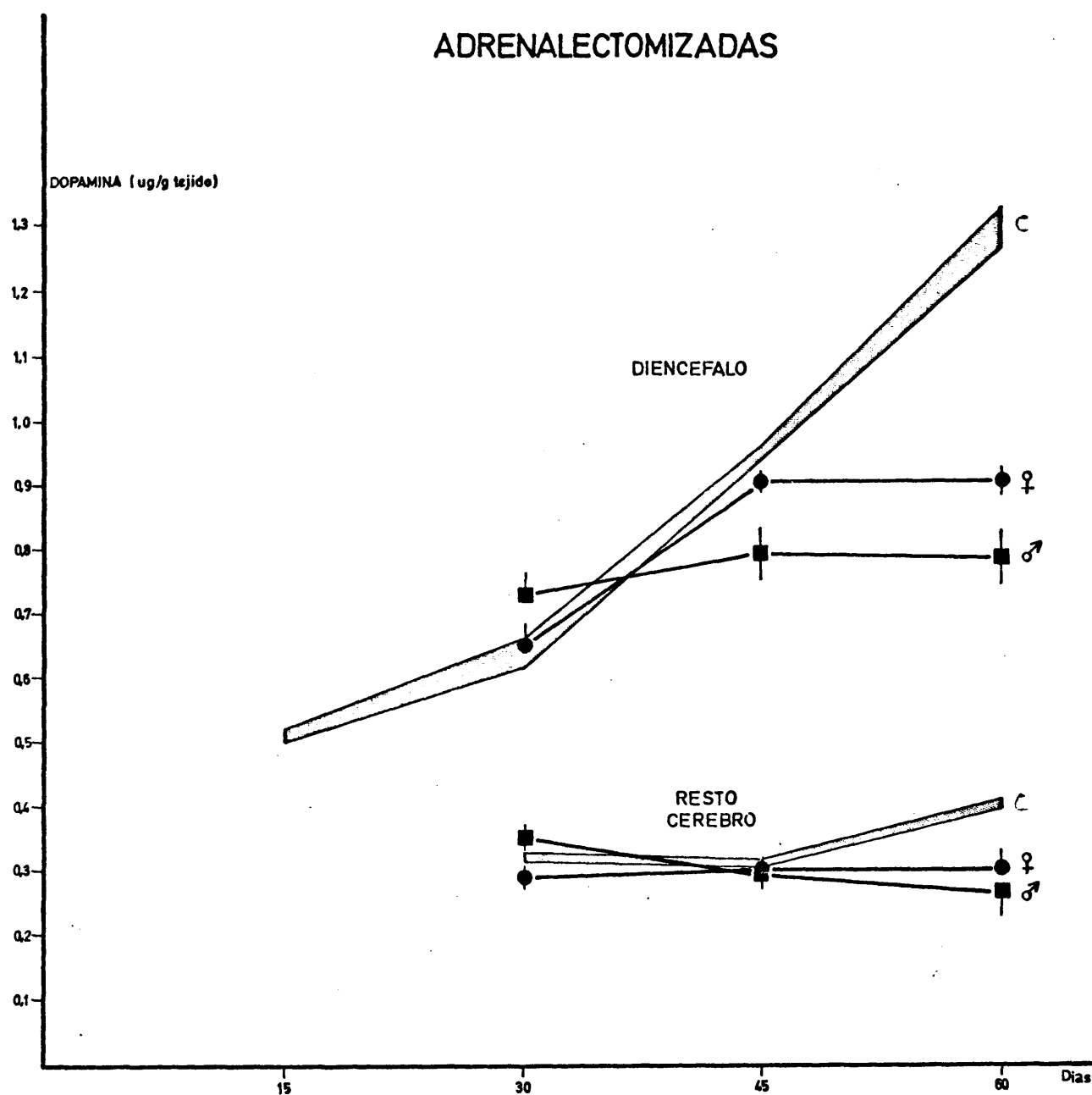


Fig.7. - Concentración de DA (ug/g tejido) en el diencéfalo y en el resto del cerebro de las ratas adrenalectomizadas ( $M \pm S.E.$ ). ( Los niveles correspondientes a los animales normales se representan por el area sombreada)

## ADRENALECTOMIZADAS

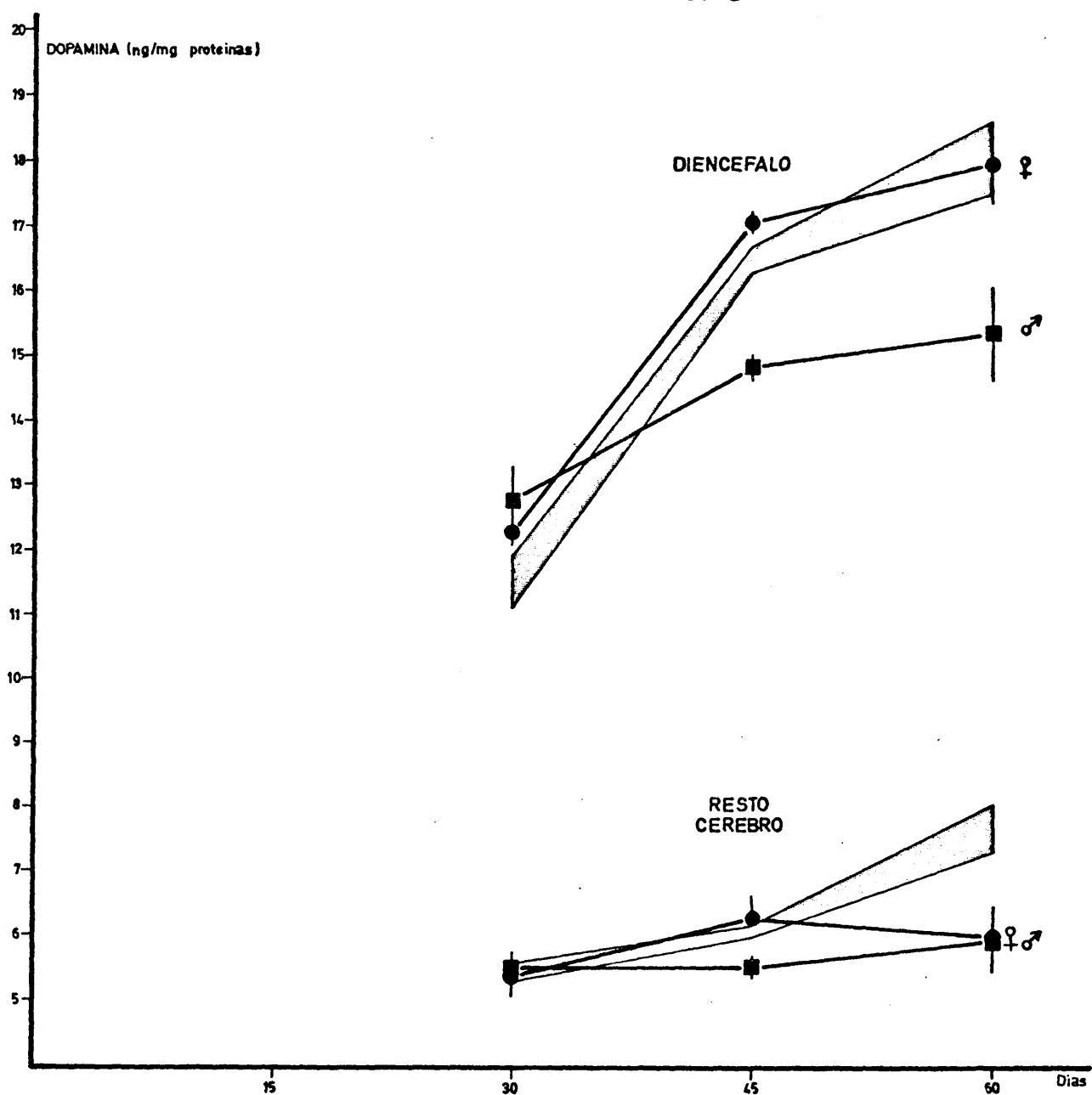


Fig.8.- Concentración de DA (ng/mg proteína) en el diencéfalo y en el resto del cerebro de las ratas adrenalectomizadas ( $M \pm S.E.$ ) (Los niveles correspondientes a los animales normales se representan por el area sombreada)

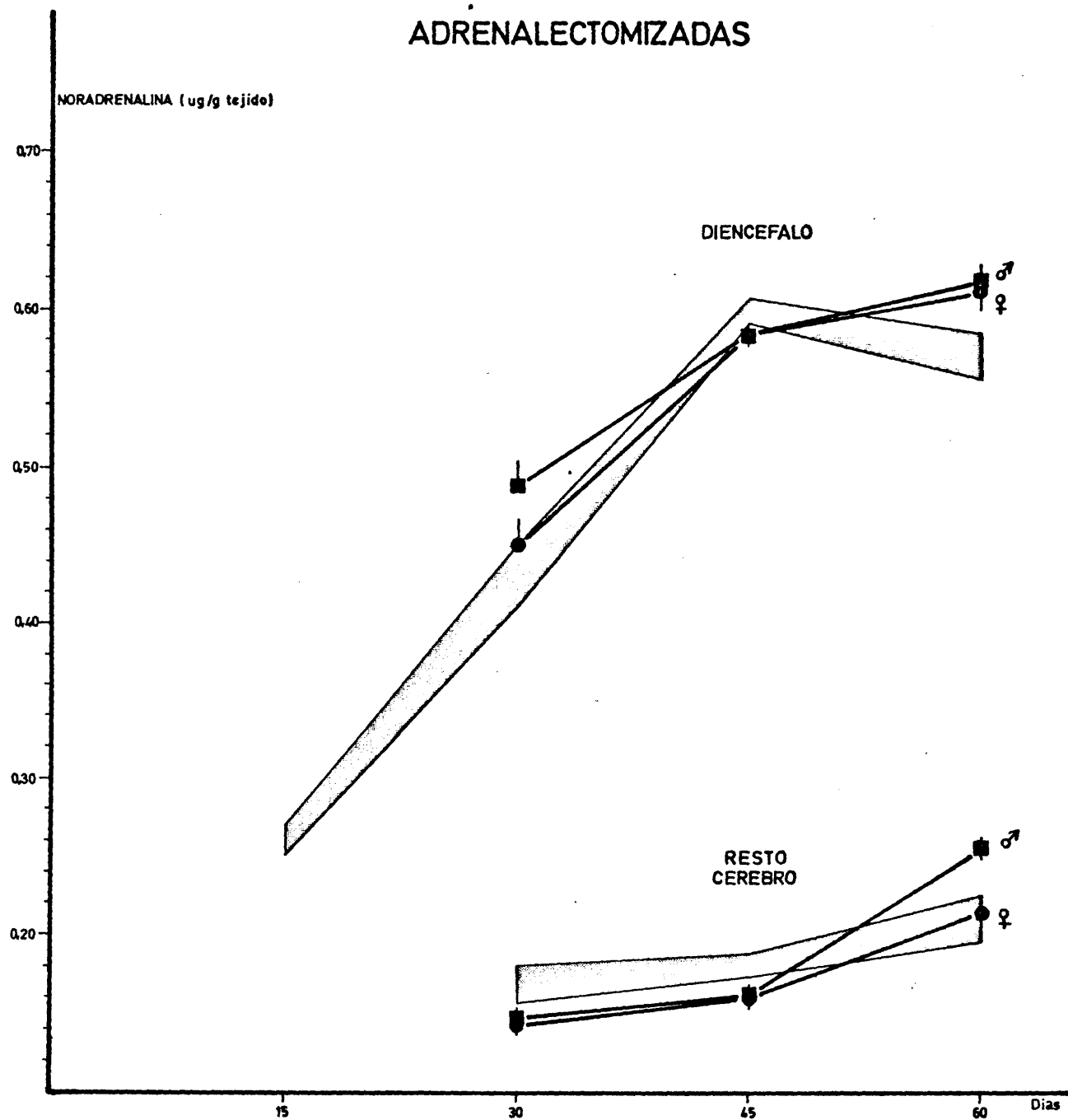


Fig.9.- Concentración de NA (ug/g tejido) en el diencéfalo y en el resto del cerebro de las ratas adrenalectomizadas ( $M \pm S.E.$ )  
(Los niveles correspondientes a los animales normales se representan por el area sombreada)

## ADRENALECTOMIZADAS

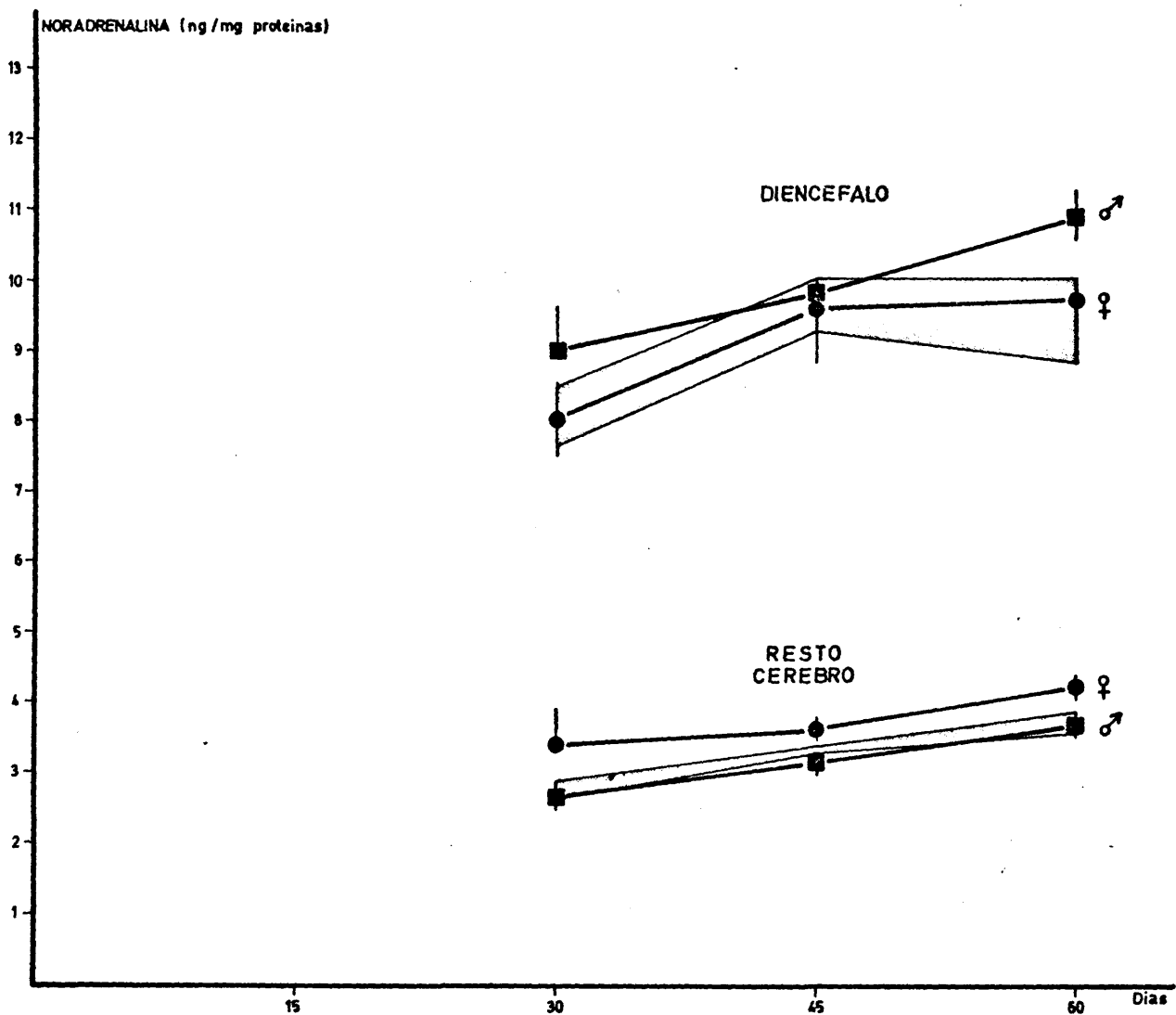


Fig.10.- Concentración de NA (ng/mg proteína) en el diencéfalo y en el resto del cerebro de las ratas adrenalectomizadas ( $M \pm S.E.$ ) (Los niveles correspondientes a los animales normales se representan por el area sombreada)

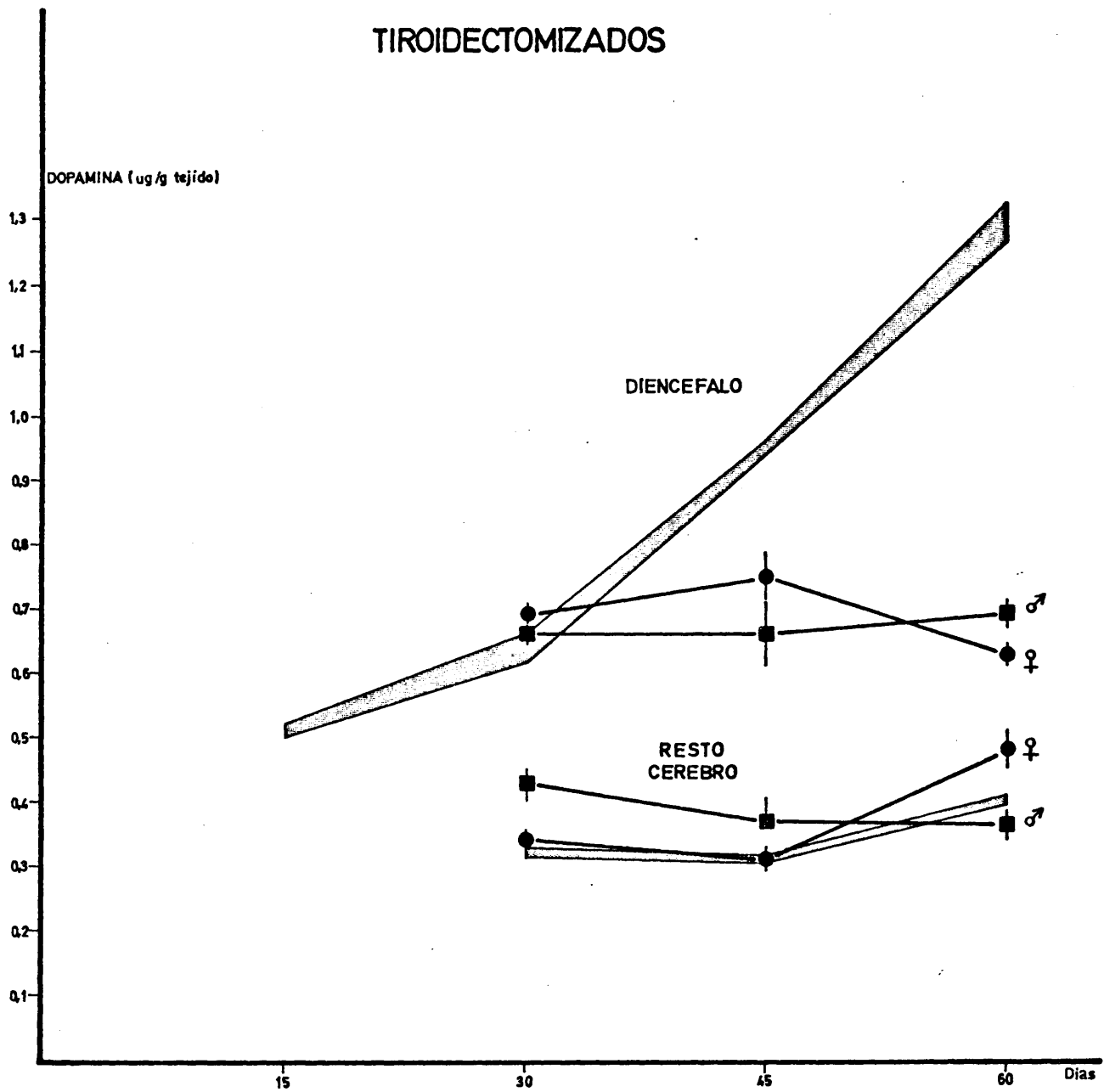


Fig.11.- Concentración de DA (ug/g tejido) en el diencéfalo y en el resto del cerebro de las ratas tiroidectomizadas ( $M \pm S.E.$ ). (Los niveles correspondientes a los animales normales se representan por el area sombreada.)

## TIROIDECTOMIZADOS

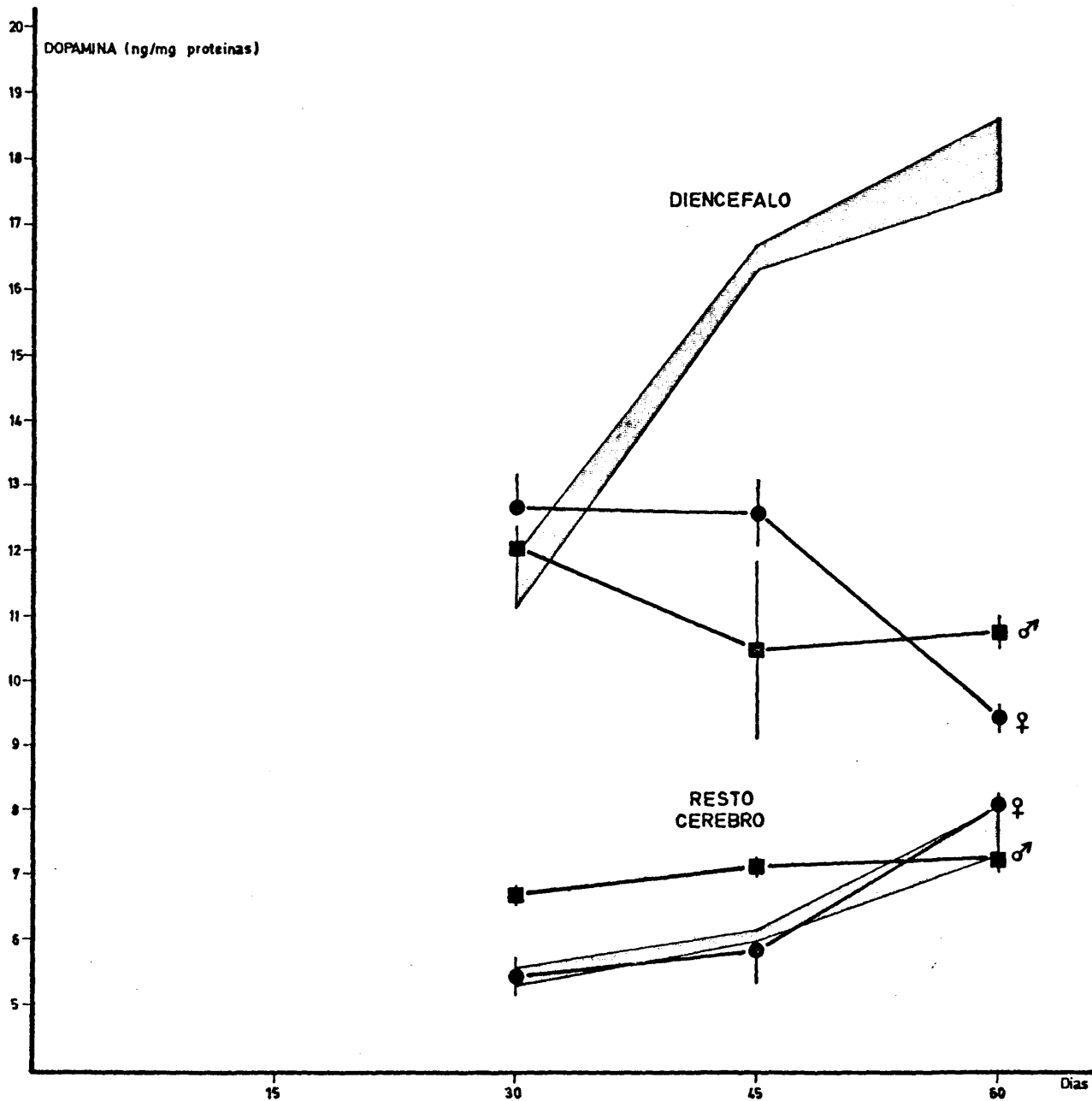


Fig.12.- Concentración de DA (ng/mg proteína) en el diencéfalo y en el resto del cerebro de las ratas tiroidectomizadas ( $M \pm S.E.$ ). (Los niveles correspondientes a los animales normales se representan por el área sombreada.)



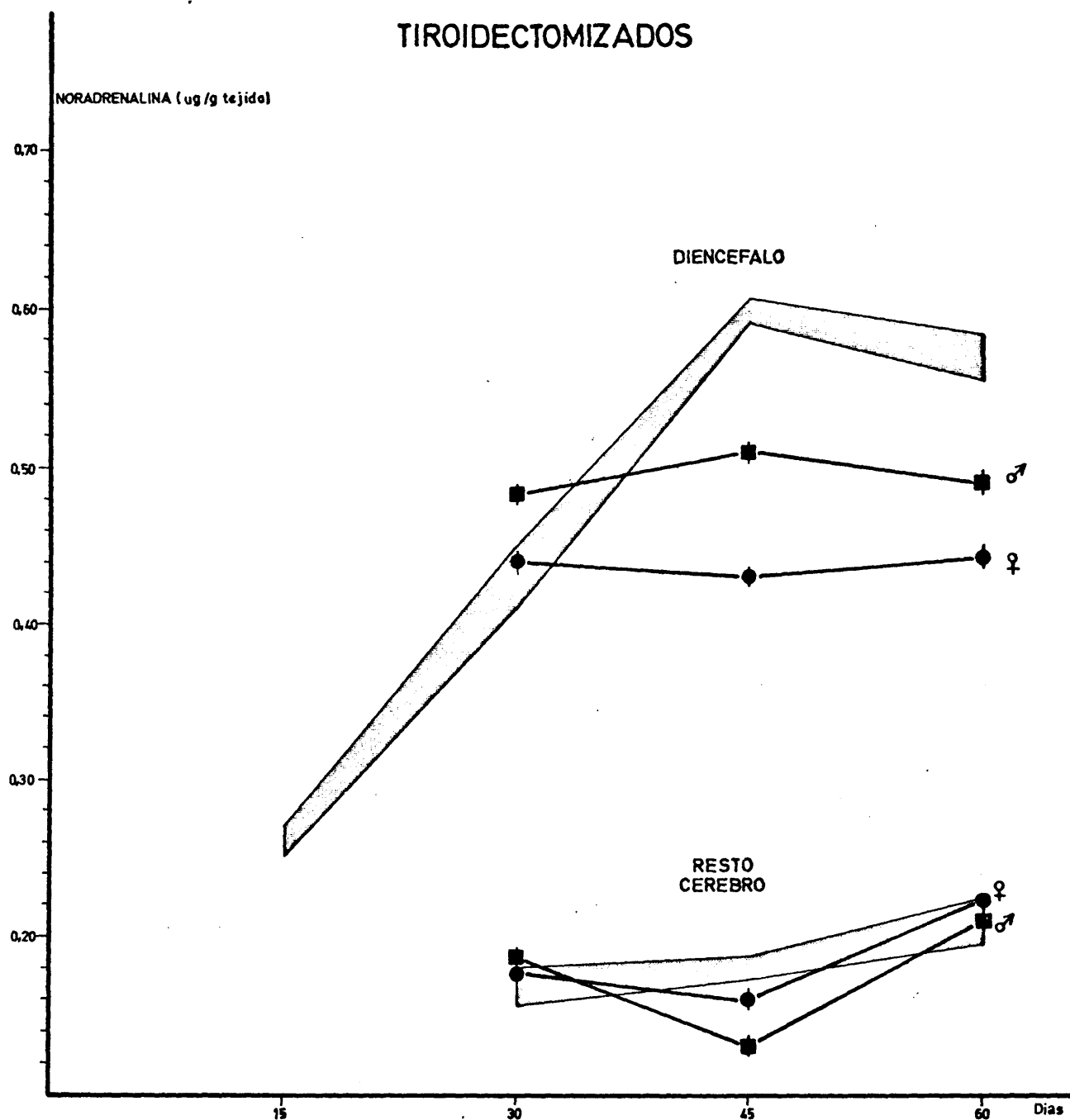


Fig.13.- Concentración de NA (ug/g tejido) en el diencéfalo y en el resto del cerebro de las ratas tiroidectomizadas ( $M \pm S.E.$ ). ( Los niveles correspondientes a los animales normales se representan por el area sombreada.)

## TIROIDECTOMIZADOS

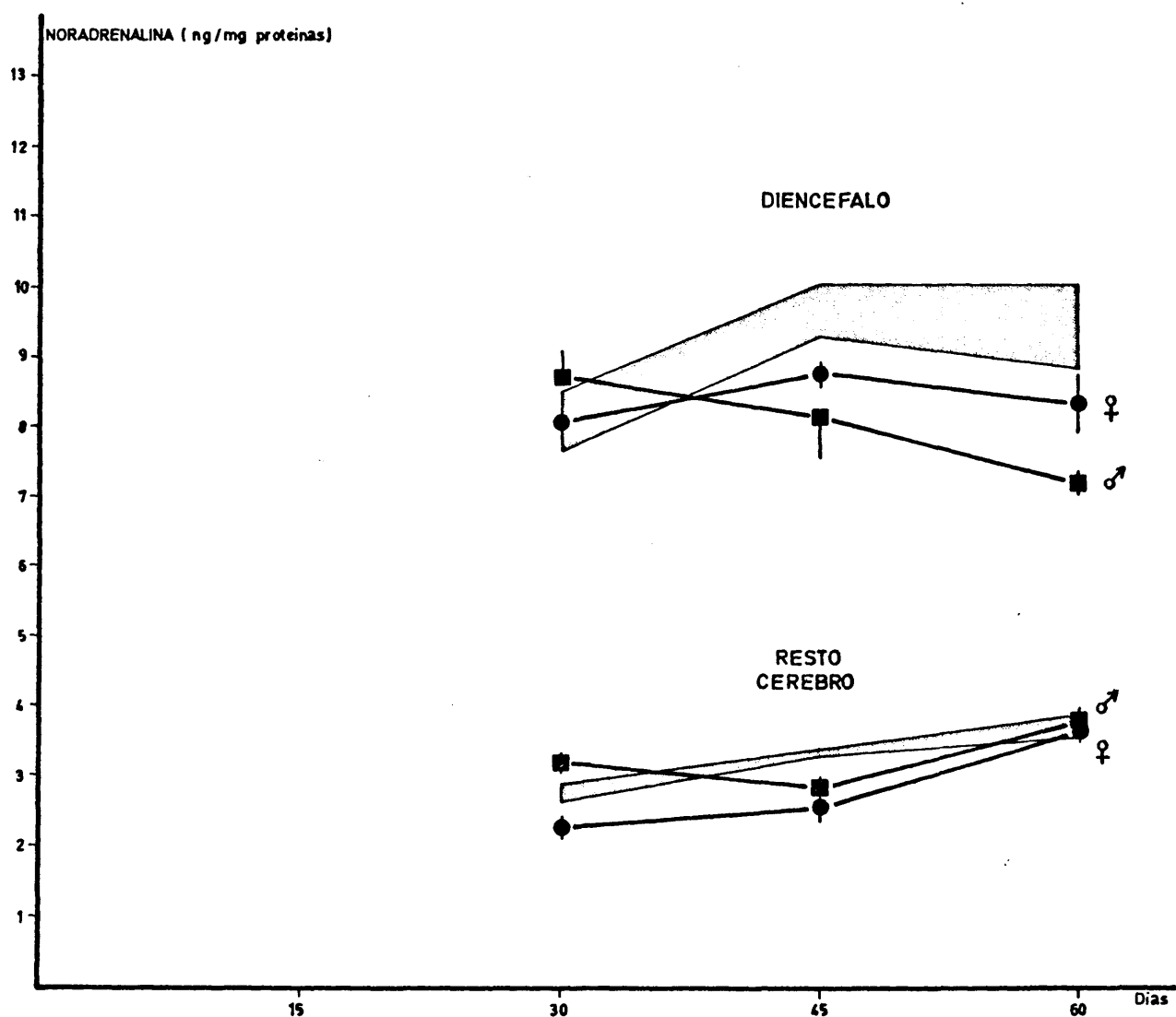


Fig.14.- Concentración de NA (ng/mg proteína) en el diencéfalo y en el resto del cerebro de las ratas tiroidectomizadas ( $M \pm S.E.$ ). (Los niveles correspondientes a los animales normales se representan por el area sombreada.)

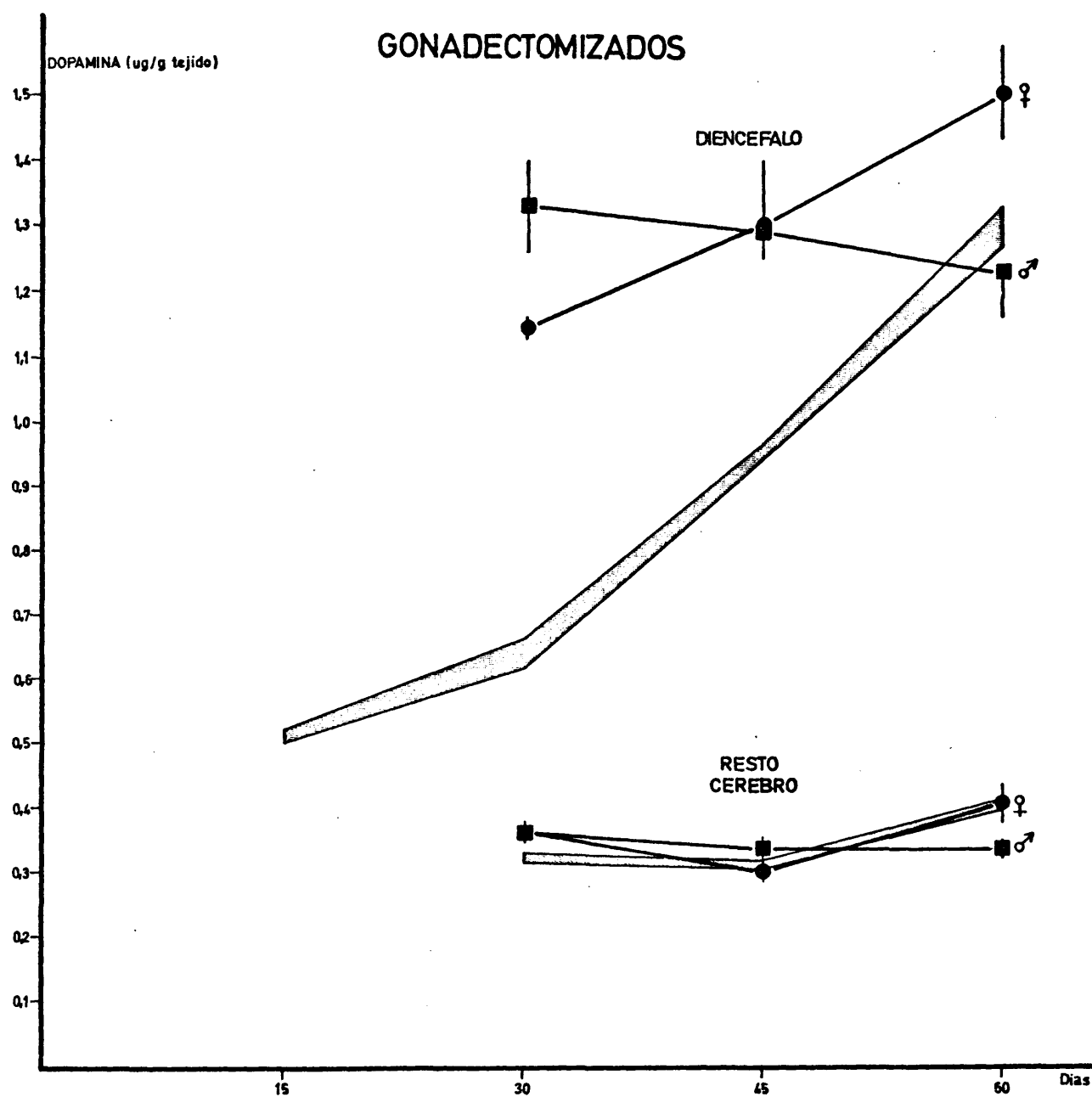


Fig.15.- Concentración de DA ( $\mu\text{g/g}$  tejido) en el diencefalo y en el resto del cerebro de las ratas gonadectomizadas ( $M \pm S.E.$ ). (Los niveles correspondientes a los animales normales se representan por el area sombreada.)

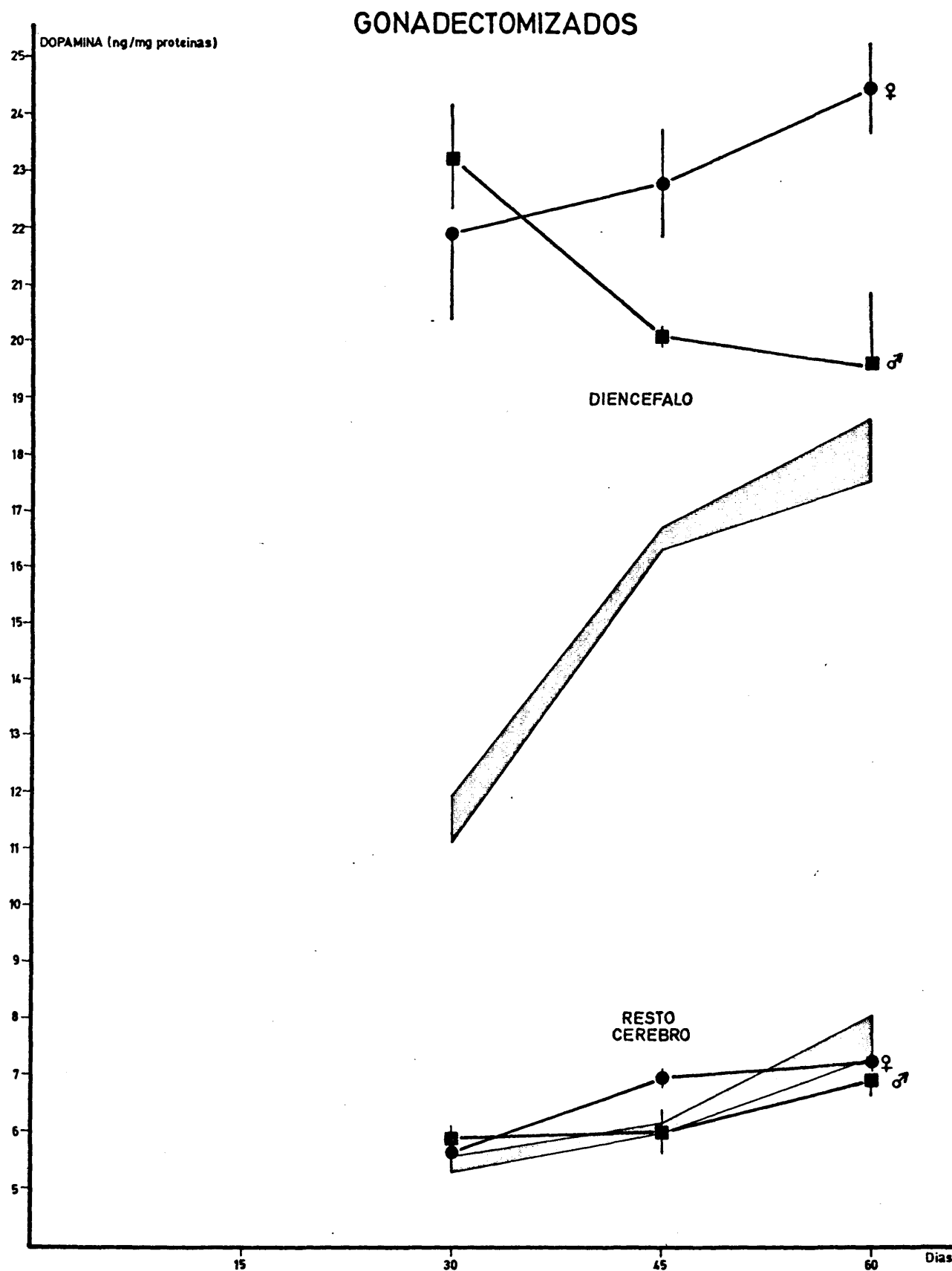


Fig.16.- Concentración de DA (ng/mg proteína) en el diencéfalo y en el resto del cerebro de las ratas gonadectomizadas ( $M \pm S.E.$ ). (Los niveles correspondientes a los animales normales se representan por el area sombreada.)

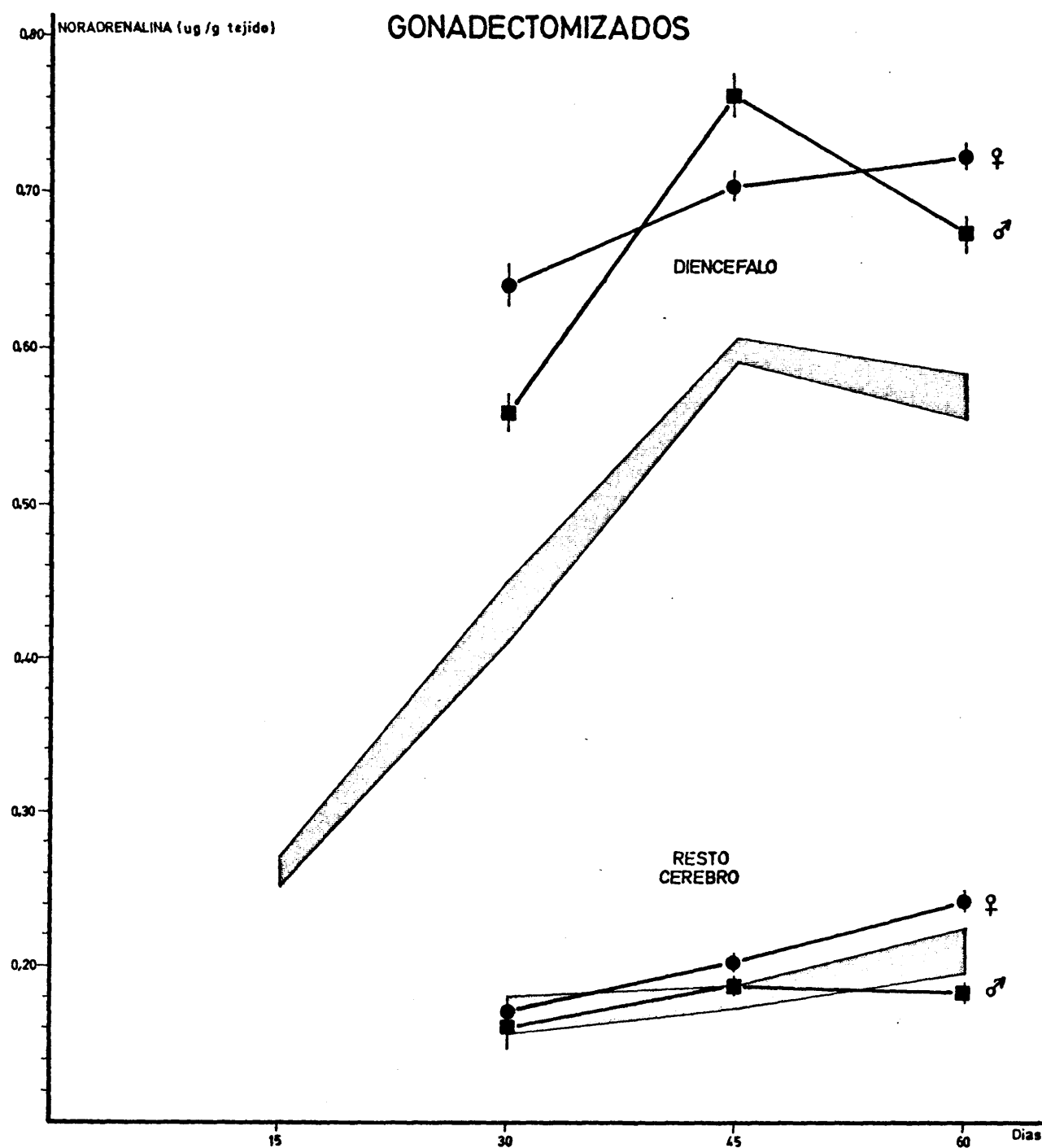


Fig.17.- Concentración de NA ( $\mu\text{g/g}$  tejido) en el diencefalo y en el resto del cerebro de las ratas gonadectomizadas ( $M \pm S.E.$ ). (Los niveles correspondientes a los animales normales se representan por el area sombreada.)

## GONADECTOMIZADOS

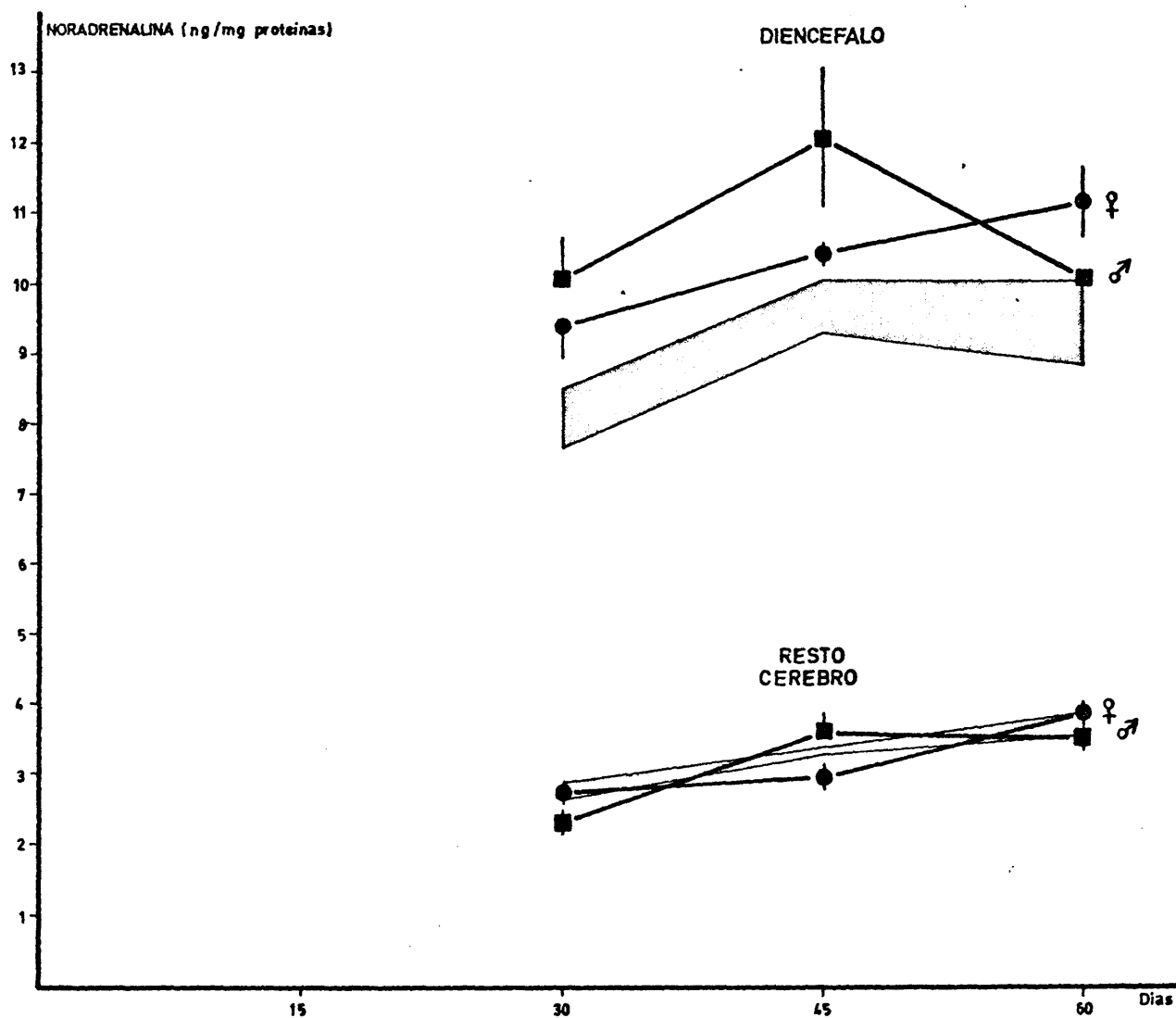


Fig.18.- Concentración de NA (ng/mg proteína) en el diencefalo y en el resto del cerebro de las ratas gonadectomizadas ( $M \pm S.E.$ ). (Los niveles correspondientes a los animales normales se representan por el area sombreada.)

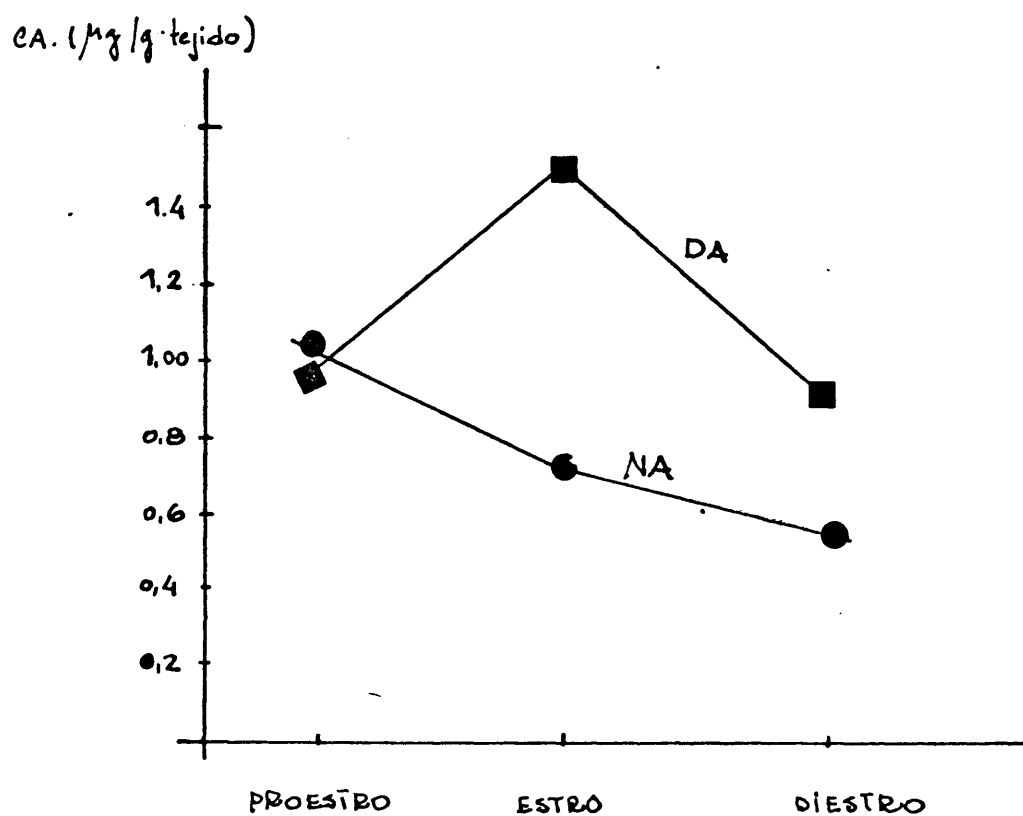


Figura 19.- Concentración de catecolaminas ( ug/g tejido) en el diencéfalo durante el ciclo estral de la rata

## DISCUSSION



## DESARROLLO DEL CEREBRO Y RIQUEZA DE DA Y NA ENTRE LOS 15 Y 60 DIAS DE EDAD EN RATAS NORMALES.

Varias funciones fisiológicas importantes, en el hombre y en los animales, dependen de las catecolaminas cerebrales; las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas cerebrales están involucradas en la regulación de la presión sanguínea y en la respiración (Henning, 1.975; Lundberg y col. 1.979), en la regulación de la temperatura (Bligh, 1.979), en la actividad locomotora (Svensson, 1.971) y en el comportamiento condicionado (Ahlenius, 1.974).

Muchas de estas funciones son imperfectas al nacer, y hay una relación entre su grado de madurez y el desarrollo gradual de las vías neuronales dopaminérgicas y noradrenérgicas centrales, lo cual ocurre principalmente durante el período prenatal y postnatal temprano. Durante la ontogenia del sistema nervioso central, la multiplicación celular, la migración celular, la sinaptogénesis, el crecimiento de axones y dendritas, así como la aparición de los receptores de membrana específicos, ocurren en diferentes períodos y se desarrollan independientemente en los distintos sistemas neuronales, tales como las vías catecolaminérgicas, serotoninérgicas, de aminoácidos y de péptidos (Hedner y Lundborg, 1.980; Patey y col, 1.980; Thornburg y Moore, 1.976) siendo constante el patrón de los cambios a través de la ontogénesis.

Estudios histológicos e histoquímicos han demostrado que las neuronas catecolaminérgicas centrales de la rata se multiplican exclusivamente durante la vida intrauterina. Se ha demostrado la existencia de neuronas DA y NA en el día 15 de la gestación (Maeda y Dresse, 1.969; Olson y Seiger

1.972) y de axones terminales durante la última etapa de vida intrauterina (Loizou, 1.972). A pesar de todo esto, la mayor parte del desarrollo de los sistemas neuronales de DA y de NA ocurre después del nacimiento. Utilizando técnicas farmacológicas y bioquímicas se han podido determinar niveles de transmisores, enzimas involucrados en su síntesis y degradación, índices de recambio y mecanismos reguladores. Los mecanismos reguladores aparecen en la rata, durante los primeros días de la vida postnatal, antes de que finalice el crecimiento neuronal, es decir antes de la maduración anatómica y bioquímica completa (Hedner y Lundborg, 1.981).

Todo ello nos llevó a estudiar los niveles de DA y de NA en el cerebro total y en el diencéfalo a lo largo del desarrollo postnatal, hasta la madurez sexual (60 días de edad) en animales machos y hembras. Las concentraciones de DA halladas por nosotros a los 15 días de edad son aproximadamente el doble de las de NA y van aumentando paralelamente hasta los 45 días. A partir de entonces se estabilizan los niveles de NA, mientras que los de DA siguen aumentando. Esto está en concordancia con lo publicado por Kellog (1.974), que la transmisión noradrenérgica madura más rápidamente que la dopaminérgica.

Entre los 15 y los 60 días de edad, la concentración de DA experimenta un incremento de casi el 200% y la NA aumenta el 150% (habiéndose ya estabilizado a los 45 días). Es decir, las concentraciones de DA y de NA en el cerebro de la rata a los 15 días de edad son el 33% y el 40%, respectivamente, de los que se encuentran en el animal adulto, hecho ya señalado por Weiner y Ganong en 1.972.

En cuanto al diencéfalo, se observan resultados análogos, si bien aquí las concentraciones de ambas aminas son

superiores a las del cerebro total.

Señalaremos finalmente que Aghajanian y Bloom (1.967) y Woodward y col. (1.971) han observado al microscopio electrónico el desarrollo postnatal de los contactos sinápticos de las neuronas monoaminérgicas y sus observaciones parecen estar de acuerdo con los resultados bioquímicos.

No hemos observado diferencias significativas entre machos y hembras en cuanto al contenido y evolución de los niveles de DA y de NA, ni en el cerebro total ni en el diencéfalo, durante los 60 primeros días de vida. Esto está de acuerdo con los resultados de Bresse y Traylor (1.972), quienes no encontraron diferencias en el contenido de estas aminas cerebrales con respecto al sexo, en ratas adultas. Por el contrario, Agrawal y col (1.966) sí observaban diferencias significativas con el sexo.

Recientemente se han señalado diferencias en las concentraciones de DA y NA en ratas machos y hembras de 12 días de edad, en diferentes regiones cerebrales. Los niveles de DA en el cerebro medio eran mayores en machos que en hembras, mientras que la NA hipotalámica era mayor en la hembra que en el macho (Wilson y Agrawal, 1.979). Nosotros no determinamos las concentraciones de las catecolaminas a esa edad, ya que la primera edad estudiada fue la de 15 días de vida. En trabajos realizados en nuestro laboratorio (Leret y col. 1.983) se ha visto que existe un dimorfismo sexual en el diencéfalo con respecto al principal metabolito de la DA, el HVA, a los 10, 15, 30 y 60 días de edad, lo que nos hace suponer la existencia de una diferencia sexual en la pauta degradativa de la DA a HVA.

## CATECOLAMINAS CEREBRALES EN ANIMALES ADRENOPRIVOS.

Se han realizado estudios acerca del efecto regulador de los corticoides adrenales sobre el tejido neural. Los lugares de acción para el mecanismo de feedback negativo parecen estar situados en el septum, hipotálamo, cerebro medio, hipocampo y amígdala (Kendall, 1.971). Otros estudios han ido encaminados a identificar los transmisores neuroquímicos involucrados en este feedback y las diferentes vías participativas en la liberación de ACTH.

Se ha pensado que varios transmisores modularían la liberación del factor descargador de corticotropina (CRF), sugiriéndose que las catecolaminas podrían actuar como neurotransmisores inhibitorios involucrados en el control del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales (Marcks y col. 1.970; Jones, 1.978; Karteszi y col. 1.981) mientras que la serotonina y la acetilcolina podrían ser estimulatorias. Además, los datos farmacológicos hacen pensar que las neuronas centrales noradrenérgicas inhiben la secreción de las hormonas hipotálámicas que controlan la secreción de ACTH por la adenohipófisis (Ganong, 1.972, 1.973, 1.974).

Ha sido sugerido también que el eje hipófisis-adrenales puede tener un papel en los desórdenes psíquicos (Carroll y Mendels, 1.976), ya que la alteración de los niveles de corticosterona tras la adrenalectomía bilateral modifica la sensibilidad de los sistemas adenilato ciclasa sensibles a las catecolaminas, en el cerebro (Mobley y Sulser, 1.980), además de hacerlo en el hígado (Bitensky y col. 1.970; Leray y col. 1.973) y en el tejido adiposo (Exton, 1.972).

En el cerebro, los niveles de esteroides adrenales

afectan a la sensibilidad de los receptores de catecolaminas acoplados al sistema adenilato ciclasa, bien de una forma directa o indirectamente (Mobley y Sulser, 1.980). En el hígado se ha demostrado que la menor sensibilidad de la adenilato ciclasa después de la adrenalectomía coincide con un incremento en el número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Wolfe y col 1.976).

El tratamiento perinatal con corticosterona influye sobre el desarrollo del cerebro. Es posible que este tratamiento empeore la conversión de DA a NA en las neuronas noradrenérgicas (Axelrod, 1.971). Estudios posteriores sobre las enzimas implicadas en el proceso confirman esta hipótesis (Lengvari y col. 1.980).

Hay diferencias en cuanto a los resultados del tratamiento con corticoides y los niveles de estos neurotransmisores, lo que puede ser debido a las diferentes edades de los animales con los que se trabaja, ya que ha sido demostrado que el efecto del tratamiento con corticosteroides sobre los niveles de serotonina en el diencéfalo es bifásico; si el animal tiene menos de 14 días se obtienen valores mas bajos que los normales, mientras que a partir de los 35 días de edad los corticosteroides provocan un aumento de serotonina en el diencéfalo (Yuwiler y Geller, 1.973).

Se ha visto que el tratamiento a los 16-18 días aumenta ligeramente las catecolaminas cerebrales o no tiene efecto alguno. De hecho, el resultado de este tratamiento tardío fue una elevación de la NA hipotalámica en el día 21, lo cual es opuesto al efecto de una exposición temprana a los corticosteroides.

Hay varios trabajos acerca del efecto de la adrenalectomía

tomía sobre las enzimas que intervienen en la biosíntesis y degradación de las catecolaminas. Shen y Ganong (1.976) observaron que la adrenalectomía causa un decremento en la actividad DBH en el hipotálamo y en el tallo cerebral, pero no en el hipocampo. Cinco días después de la operación la actividad DBH sigue deprimida en el tallo cerebral, pero en el hipotálamo retorna al valor normal. Estos datos están de acuerdo con los de Kizer y col (1.974), los cuales no aprecian cambios en la actividad DBH, 8 - 9 días después de la adrenalectomía, en varios núcleos hipotalámicos. Dos días después de la adrenalectomía, cuando la secreción de ACTH no es muy elevada (Dallman y col. 1.972), la actividad DBH hipotalámica es baja; pero cinco días después, cuando la secreción de ACTH aumenta, la DBH hipotalámica vuelve a su actividad normal. Van Loon y Mascardo (1.975) observaron que la actividad DBH hipotalámica decrece 15 días después de la hipofisectomía.

En cuanto a la tirosina hidroxilasa, Kizer y col. (1.974) apreciaron un decremento en la eminencia media, núcleo arqueado y núcleo dorsomedial, nueve días después de la adrenalectomía, mientras que Rastogi y Singhal (1.978) observaron que la adrenalectomía eleva la actividad de esta enzima en el hipotálamo y en el estriado, no habiendo cambios en la COMT, pero sí en la MAO, que aumenta en un 122% en los animales adrenalectomizados, tomando los valores de los controles como el 100%. Estos cambios son más pronunciados 15 días después de la adrenalectomía. Asimismo Veals y col (1.977) comprueban que la administración crónica de dexametasona produce un ligero descenso de la actividad monoaminooxidasa en el cerebro de la rata, que se reflejaba por los bajos niveles de <sup>14</sup>C-ácido homovanílico y un incre-

mento de los niveles de  $^{14}\text{C}$ - 3 metoxitiramina tras la inyección intracisternal de  $^{14}\text{C}$ -DA. Además se observó que otros glucocorticoides ( $16\alpha$  - metil diclororisona,  $16\beta$  - metil prednisona y prednisolona) tienen un efecto similar sobre el metabolismo de la  $^{14}\text{C}$ -DA. Por otro lado, la desoxicorticosterona, la progesterona, el estradiol y la testosterona no exhiben esta propiedad. Esto indica que el tratamiento crónico con glucocorticoides tiene un ligero efecto inhibitorio sobre la MAO cerebral.

Nosotros hemos observado que siete días después de realizada la adrenalectomía (30 días de edad), no hay variaciones en cuanto al contenido de DA y de NA en el cerebro, tanto en el diencéfalo como en el resto del tejido, pero en el caso de la DA disminuyen los niveles a los 45 y 60 días de edad en los animales adrenaoprivos con respecto a los controles, siendo este efecto más marcado en los animales macho. Las concentraciones de DA en los animales adrenalectomizados se estabilizan aparentemente a los 45 días de edad.

En cuanto a la NA cerebral, no se aprecian diferencias significativas en su contenido después de la adrenalectomía, aumentando su concentración con el tiempo según la curva normal.

Los datos encontrados en la bibliografía referentes al efecto de la adrenalectomía sobre las concentraciones de ambas catecolaminas cerebrales son contradictorios. Algunos autores observan que la adrenalectomía no altera el contenido de la NA hipotalámica y cerebral (Pfeifer y col. 1.963; De Schaepdryver y col., 1.969; Fuxe y Hokfelt, 1.965) ni de NA y DA en el hipotálamo y en el tallo cerebral (Shen y Gannon, 1.976), mientras que otros encuentran un decremento de estas aminas después de la adrenalectomía. Así, Kawa (1.977)

observó, en ratas macho a las dos semanas de la operación, un decremento de los niveles de NA en el hipotálamo, cerebro medio y corteza; este efecto parece ser debido a cambios del turnover de la amina, pues su  $t_{1/2}$  aumenta en todas las áreas cerebrales examinadas. Así mismo, Rastogi y Singhal (1.978) apreciaron también una disminución de NA en el hipotálamo y en el cuerpo estriado, y de DA en el tallo cerebral y en el estriado, 15 días después de la adrenalectomía, en ratas macho.

Por otro lado, inyectando DA y NA marcadas en ratas adrenalectomizadas, se observó mayor tasa de desaparición del material marcado en el hipotálamo, hipocampo y neocorteza. Estos cambios pueden ser evitados por administración de cortisona (Endroczi y col., 1.976).

Los resultados obtenidos por nosotros podrían explicarse por el aumento del turnover de NA, señalado por algunos autores (Fuxe y col., 1.973 a y b; Javoy y col., 1.968; Shen y Ganong, 1.976), después de la adrenalectomía. Hay, por tanto, un incremento de la biosíntesis de NA, el paso de DA a NA aumenta (Shen y Ganong, 1.976) y también se incrementa el metabolismo de esta última. La causa de este incremento del turnover de la NA es desconocida. Fuxe y col. en 1.973 demostraron que el tratamiento con glucocorticoides a ratas adrenalectomizadas reduce el turnover de NA a nivel normal, y observaron también que el tratamiento de los animales normales con glucocorticoides incrementaba el turnover de esta catecolamina.

El incremento observado en animales adrenalectomizados es inconsistente con el decremento de la tirosina hidroxilasa observada por Kizer y col (1.974) en la eminencia media, en el núcleo arqueado, y en el núcleo dorso medial, así como



con la disminución de la actividad DBH "in vitro" que observaron Shen y Ganong (1.976a).

Lo primero se podría explicar por la dificultad de comparar partes del hipotálamo con el hipotálamo entero, y lo segundo nos podría indicar, bien que la DBH no es el paso limitante en las neuronas noradrenérgicas, o bien que la inhibición "in vitro" no se da "in vivo". Shen y Ganong, en un trabajo posterior en el mismo año, estudiaron la actividad DBH "in vivo" y vieron que, cinco días después de la adrenalectomía, la actividad DBH en el hipotálamo era normal, mientras que en el tallo cerebral continuaba baja. Este dato no está en contradicción con el de Kizer y col. (1.974), los cuales propugnaban que no había cambios en la actividad DBH en varios núcleos hipotalámicos 8-9 días después de la adrenalectomía.

Todo esto está en desacuerdo con lo encontrado por Kawa y col. (1.977), los cuales observaron una disminución del turnover de NA.

El hecho de que nosotros hayamos observado que el resto del cerebro sigue la misma pauta que el diencefalo, hace pensar que este último (el hipotálamo) es el nexo final para la integración de toda la información neuroendocrina, pero es claro que las fuentes de esta información derivan de otras porciones del cerebro, particularmente del sistema límbico, el cual está involucrado en la regulación de la ritmicidad circadiana y en el feedback negativo operado por los corticoides.

Estos cambios en las aminos centrales parecen ser específicos de los esteroides adrenales, ya que la administración de corticosterona durante siete días, después de ocho

días de la adrenalectomía, revierte los efectos observados (Rastogi y col. 1.978). Esto sugiere que la inestabilidad emocional producida durante la alteración de la función adrenocortical puede estar asociada a un metabolismo anormal de las catecolaminas cerebrales.

#### CATECOLAMINAS CEREBRALES EN ANIMALES TIROPRIVOS.

Durante el primer mes de vida postnatal, se producen los cambios más acusados en la maduración bioquímica del SNC. La tiroidectomía no sólo dificulta el crecimiento normal del cuerpo y del cerebro, sino que también influye en el desarrollo normal de los neurotransmisores; la tiroxina tiene una gran influencia sobre la maduración morfológica y bioquímica del cerebro (Balazs y col. 1.975).

El tratamiento perinatal con tiroxina produce un incremento de la NA mesencefálica y de la NA en el hipotálamo a los 21 días de edad. Los cambios sobre el contenido de DA en el cerebro también parecen ser significativos tras el tratamiento con tiroxina, la cual causa disminución de la DA mesencefálica entre los días 16 y 21 (Lengvari y col., 1.980).

Los efectos de la tiroxina sobre la maduración del cerebro son sólo temporales; su influencia se ejerce al comienzo de la finalización de los procesos de desarrollo (Balazs, 1.971), lo cual explica que no existan diferencias entre los controles y los animales tratados cuando se les administra la hormona el día 45 (Lengvari y col., 1.980).

La tiroidectomía produce un decremento de la TRH hipotalámica y un incremento de la TSH. La TRH juega un papel importante en el SNC, independientemente del de la hipófisis

(Jackson y col., 1.974); así se ha visto, en ratas anestesiadas con éter, que la inyección intravenosa de TRH produce un despertar rápido (10 segundos), siendo improbable que esta acción del tripéptido esté mediado por el eje hipófisis- tiroides (Stolk y Nisula, 1.975).

Varios autores han sugerido una relación directa entre la TRH y las catecolaminas contenidas en los sistemas neuronales cerebrales. La administración aguda de este compuesto produce un efecto inhibitorio directo sobre la actividad de la enzima dopamina-  $\beta$ - hidroxilasa en las neuronas noradrenérgicas del tallo cerebral (Stolk y Nisula, 1.975). Además se observó, en pacientes psiquiátricos con depresión un rápido mejoramiento de la sintomatología después de la administración de TRH (Kastin y col., 1.972; Prange y col., 1.972). Por último, se han encontrado evidencias anatómicas en la EM de la participación de los terminales nerviosos catecolaminérgicos en la secreción de TRH, y experimentos "in vitro" e "in vivo" ponen de manifiesto que tanto la DA como la NA incrementan la liberación de TRH (Frohman, 1.980).

Los resultados obtenidos por nosotros muestran que la extirpación del tiroides produce alteraciones en el desarrollo de ambas catecolaminas, sobre todo en el diencéfalo. Siete días después de la tiroidectomía hay una estabilización de los niveles de DA y de NA; es como si se frenara el desarrollo normal de los neurotransmisores a lo largo de la vida postnatal.

Las concentraciones de DA en el diencéfalo de ratas macho, 22 y 37 días después de la operación (45 y 60 días de edad) son de un 29% y un 40% y, para las hembras tiroidectomizadas, son de 21% y 43%, inferiores a los animales controles.

Estos resultados concuerdan con los descritos por Hrdina y col (1.975), los cuales encontraron, en cerebro de ratas macho, 30 días después de la tiroidectomía, una disminución de la concentración de DA de un 46% con respecto al valor control.

En cuanto a la concentración de NA en el diencéfalo, nosotros encontramos, en ratas macho a los 45 y 60 días de edad, una disminución de un 15% en ambas edades y, en ratas hembras, un 27% y un 22% respectivamente. Esto está también en concordancia con lo hallado por Rastogi y Shinghal (1.974) que encontraron, 24 horas después de la tiroidectomía, un decremento de las catecolaminas y de la indolamina 5HT en el cerebro. Además se sabe que el hipertiroidismo incrementa el "turnover" de las catecolaminas en el cerebro del ratón (Engstrom y col. 1.974).

Igualmente, en ratas tratadas con TRH hay una aceleración del "turnover" de NA en la corteza cerebral (Keller y col. 1.974).

Por otro lado, Rastogi y Shinghal (1.974) describen un decremento de la actividad de la enzima biosintética tirosina hidroxilasa, en cerebro de ratas tiroprivas, catorce días después de la tiroidectomía. Esto indica que la hormona del tiroides puede tener una influencia reguladora sobre el metabolismo de DA y NA en el desarrollo del cerebro, controlando la biosíntesis de estos neurotransmisores por acción directa sobre la enzima limitante.

Otros autores, sin embargo, encuentran, en determinadas regiones cerebrales, un incremento de la tirosina hidroxilasa 21 días después de la tiroidectomía, en la zona empalizada media de la EM (Nakahara y col. 1.979) y en el

tracto dopaminérgico estriatal (Stolk y Nisula, 1.975). Por otra parte, Kizer y col (1.978) observan que la tiroidectomía incrementa el "turnover" de la DA en la eminencia media, no alterando el "turnover" de la NA; lo que sugiere un papel estimulador de las neuronas dopaminérgicas en la regulación de la secreción de TRH a nivel de la EM.

La restauración de las aminos cerebrales en ratas tiroidectomizadas, y de sus enzimas sintetizantes, cuando se las trata con tiroxina indica que los cambios observados en el metabolismo neuronal son específicos de la hormona del tiroides.

Por lo tanto, el comportamiento depresivo debido al estado cretinoide, así como la disminución de la actividad locomotora y el empeoramiento del comportamiento "arousal", observado en animales hipotiroideos, puede ser debido a niveles subnormales de ambas catecolaminas en los lugares sinápticos.

#### CATECOLAMINAS CEREBRALES EN HEMBRAS OVARIECTOMIZADAS.

En el hipotálamo están localizadas no sólo las neuronas productoras de las hormonas descargadoras de las gonadotropinas adenohipofisarias (Crowley, 1.982), sino también los terminales nerviosos del sistema dopaminérgico tuberoinfundibular y de ciertas neuronas noradrenérgicas. Así pues, la DA y la NA pueden influir sobre la secreción de LH, FSH y PRL (Weiner y Ganong, 1.978; Simpkins y col., 1.979 y 1.980a; Borrel y col. 1.979). Por otra parte, las hormonas ováricas estradiol y progesterona, actúan sobre el hipotálamo y sobre la hipófisis regulando, por un mecanismo de "feedback" negativo, la secreción de LHRH, LH y PRL, en el que intervienen los

sistemas catecolaminérgicos (Goodman y Knobil, 1.981). Después de la ovariectomía aumenta la secreción de LH por la adenohipófisis y parece ser que las catecolaminas están implicadas en el proceso, pues cuando las concentraciones de DA y de NA están disminuídas se inhibe dicho incremento de la secreción de LH (Ojeda, 1.973).

Según nuestros resultados, la ovariectomía provoca un aumento muy acusado de las dos aminos en el diencefalo: la concentración de DA llega a ser un 70% superior a la de los animales control y la de NA un 40%. El nivel de DA en el diencefalo de las ratas ovariectomizadas, entre los 30 y los 60 días de edad, aumenta paralelamente al de los controles, y sigue siendo un 37% mayor que el de éstos a los 60 días.

En cuanto a la NA, cuya concentración en el diencefalo se estabiliza a los 45 días en los animales normales, sigue aumentando en las ratas ovariectomizadas y llega a ser un 50% superior a los controles en el día 60.

La incidencia de la gonadectomía sobre los niveles de las catecolaminas cerebrales es diversa según los distintos autores. Para unos, hay aumento después de la operación y se restauran los valores normales por tratamiento con esteroides gonadales (Lofstrom y col., 1.977; Munaro, 1.977; Crowley y col., 1.978). Gudelski y col (1.977) observaron también aumento de DA en la eminencia media a los 37 días de la ovariectomía, mientras que la NA no se alteraba. Ya en 1.971 había señalado Keller un aumento de la fluorescencia en las neuronas del sistema dopaminérgico tuberoinfundibular después de gonadectomizar a los animales; y en 1.975 Greengrass y Tonge demostraron que el "turnover" de DA y de NA en el hipotálamo y en el sistema límbico era más intenso en las ratas operadas que en las normales.

Por el contrario, otros autores (Carr y col., 1.975; Wise y col., 1.981) no observan cambios significativos de las catecolaminas cerebrales después de la ovariectomía.

Estas discrepancias en los resultados pudieran ser debidas, en algunos casos, a los diferentes tiempos transcurridos desde la operación y a las distintas regiones cerebrales consideradas.

Como responsables de los cambios en la concentración de catecolaminas del cerebro hemos de considerar, en primer lugar, si la ovariectomía causa alteraciones de las actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis y la degradación de estas aminas. Según Kizer (1.974), la gonadectomía provoca incremento de la actividad tirosina hidroxilasa. Nosotros (Leret y col., 1.983) hemos observado que las concentraciones de HVA en el diencéfalo disminuyen tras la ovariectomía, en la rata. Podemos pensar, pues, que en ausencia de ovarios se intensifica la biosíntesis de DA y de NA, al tiempo que disminuye la degradación de la DA vía HVA. Tal vez esto pueda explicar la aparición de ciertos desórdenes afectivos, acompañados de trastornos hormonales, en la mujer, tales como el síndrome premenstrual, la depresión postparto, el síndrome de la menopausia y las depresiones provocadas, en algunas mujeres, por los contraceptivos orales.

Otra posible causa de las variaciones de DA y NA en el hipotálamo cuando se extirpan las gónadas es la anulación del mecanismo feedback negativo entre las hormonas sexuales y el hipotálamo. En tal caso habría que admitir que las hormonas gonadales circulantes regulan el metabolismo de las aminas, bien directamente o bien a través de su efecto sobre la secreción de las hormonas hipofisarias FSH y LH. Crowley

(1.982) señala que siempre van paralelos los procesos de liberación de LH y el "turnover" de NA en el hipotálamo, de tal forma que la administración de hormonas ováricas que reducen la secreción de LH también disminuye el "turnover" de la NA. Otros autores (Moore y col., 1.980) encuentran que el tratamiento agudo con estrógenos hace disminuir el "turnover" de DA, mientras que el tratamiento prolongado tiene el efecto contrario, si bien ocurre que, en tal caso, se elevan los niveles de PRL; es decir, la DA hipotalámica está sometida a la acción reguladora de la PRL.

Según Gordon y col (1.980, 1.981) los estrógenos actúan sobre las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares alterando el número de receptores DA, con lo que disminuye su eficacia postsináptica.

Nosotros hemos estudiado los cambios de las catecolaminas diencefálicas durante el ciclo estral de la rata. La concentración de NA es máxima en proestro, disminuye durante el estro y es mínima en diestro; mientras que la concentración de DA es prácticamente igual en proestro y en diestro y presenta un pico muy acusado durante el estro. Estos resultados concuerdan con los publicados por Honma y Wuttke (1.980) y Keller y Lichtensteiger (1.971). En relación con este tema, Redmond y col. (1.975) estudiaron las variaciones de varias enzimas implicadas en el metabolismo de las catecolaminas, concretamente la MAO y la DBH, durante el ciclo estral.

#### CATECOLAMINAS CEREBRALES EN MACHOS CASTRADOS.

El ritmo de secreción de la LH y de la PRL es distinto en el macho que en la hembra. El control neural de la función reproductiva depende del sexo y la causa de tal diferen-



ciación sexual parece ser la exposición o no del cerebro a los andrógenos durante una fase de su desarrollo funcional, que se conoce con el nombre de período crítico (Harlan y col. 1.979). Este período crítico se extiende, en la rata, hasta muy pocas horas después del nacimiento y, durante él, los andrógenos inducen cambios en determinados circuitos neuronales en regiones específicas del cerebro, tales como el área pre-óptica y el hipotálamo medio basal.

Gorski (1.971) observó diferencias sexuales en la regulación de la secreción de LH por la hipófisis y Neill (1.974) hizo observaciones similares con respecto a la PRL. Era inmediato relacionar estos hechos con el efecto de los andrógenos sobre el hipotálamo durante el período crítico.

Demarest y col. (1.981) han demostrado que las neuronas del sistema dopaminérgico tuberoinfundibular de la rata hembra son más activas que las del macho, aunque su desarrollo morfológico en ambos sexos es similar y la concentración de DA en la eminencia media es la misma. En ninguna otra región del cerebro aparecen diferencias sexuales de este tipo.

El funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-testículo está controlado, al menos en parte, por el "feedback" negativo que ejercen los andrógenos circulantes sobre el hipotálamo y la adenohipófisis. Simpkins y col. (1.980b) relacionan la acción inhibidora de la testosterona sobre la descarga de LHRH con el aumento de la actividad catecolaminérgica en el hipotálamo. Ya en 1.979 había señalado Vermes que existe una relación inversa entre el estado funcional del eje hipófisis-testículo y el sistema dopaminérgico del hipotálamo.

Nosotros observamos un aumento muy acusado de las catecolaminas diencefálicas a los siete días de la castración,

cuando la operación se realiza en edad temprana. La concentración de DA en el diencéfalo llega a ser casi el doble de la que presentan los controles, aunque después disminuyen las diferencias y a los 60 días de edad se igualan.

También la NA diencefálica aumenta después de la castración, aunque más moderadamente, y el curso de los acontecimientos es distinto: sigue aumentando hasta los 45 días y después desciende, pero a los 60 días es todavía un 11% superior a los controles.

La gonadectomía, en los machos, no altera significativamente los niveles de ambas aminas en el resto del cerebro.

Si comparamos estos resultados con los de las hembras gonadectomizadas vemos que hay grandes diferencias en cuanto a los efectos causados por la operación sobre las catecolaminas diencefálicas. Tanto en machos como en hembras se aprecian aumentos de ambas catecolaminas en el diencéfalo a los siete días de la operación, sobre todo para la DA; pero así como en las hembras los niveles de DA van subiendo, en días sucesivos, paralelamente a los controles, en los machos se mantienen o disminuyen ligeramente, de tal forma que a los 60 días quedan igualados con los controles. En cuanto a la NA, su evolución posterior sigue más o menos el perfil normal, pero en las hembras no se estabiliza el nivel a los 45 días, sino que sigue aumentando y las diferencias con los controles se hacen más acusadas a los 60 días. (Fig. 17 y 18).

Estos datos concuerdan con resultados anteriores obtenidos por nosotros (Leret y col., 1.983) referentes a la concentración de HVA en el diencéfalo de los animales castrados, que era del orden de la mitad que en los controles a los 30 días y recuperaba su valor normal a los 60 días.

El efecto de la castración sobre las catecolaminas cerebrales en la rata macho es distinto según los diversos autores. Simpkins (1.980b) detectó un aumento del "turnover" de NA en el hipotálamo medio basal, que volvía a la normalidad tras el tratamiento con testosterona, y no apreciaron cambios en la DA. En contraste con ello, Kizer (1,978) había observado un aumento muy notable de la DA en la eminencia media a los 7 días de la castración. Anteriormente, el mismo autor (Kizer, 1.974) había señalado un incremento de la tiro-sina hidroxilasa provocado por la operación.

Según Vermes (1.979), la concentración de las catecolaminas en el cerebro a las cuatro semanas de la orquidectomía es igual que en los controles.

Lo que llama la atención es el hecho de que a los 60 días de edad, después de la extirpación de los testículos, vuelvan a la normalidad espontáneamente las concentraciones de DA y de su metabolito, el HVA, sin tratamiento alguno con andrógenos. Cabría la posibilidad de que, en tal caso, la corteza suprarrenal supliera la carencia de andrógenos incrementando su síntesis a través de rutas secundarias (Jara, 1.976; Fujieda y col., 1.981); esta hipótesis será objeto de estudio en trabajos posteriores.

## CONCLUSIONES

- 1) Hay un incremento progresivo de las concentraciones de DA y NA en el cerebro de rata durante el desarrollo postnatal, estabilizándose los niveles de NA a los 45 días de edad mientras que los de DA siguen aumentando hasta los 60 días de vida.
- 2) La región diencefálica es más rica en catecolaminas que el resto del cerebro.
- 3) No hay diferencias significativas en las concentraciones de DA y de NA entre ratas machos y hembras, a las edades estudiadas.
- 4) La adrenalectomía impide que aumente la concentración de DA en el diencéfalo durante el desarrollo postnatal, siendo este efecto más marcado en animales machos que en hembras, mientras que la NA diencefálica no experimenta cambios muy aparentes después de la adrenalectomía, elevándose ligeramente sus niveles entre los 45 y los 60 días de edad. Tal vez, en ausencia de esteroides adrenales se acelere el paso de dopamina a noradrenalina.
- 5) Las concentraciones de DA y de NA en el resto del cerebro después de la adrenalectomía siguen la misma pauta que en el diencéfalo, lo que hace pensar que todos los sistemas catecolaminérgicos son sensibles a los esteroides adrenales.
- 6) La tiroidectomía provoca alteraciones muy marcadas en el desarrollo de ambas catecolaminas en el diencéfalo, estabilizándose en los niveles que tenían en el momento de la extirpación del tiroides; la DA disminuye ligeramente entre los 45 y los 60 días de edad. Parece ser que las hormonas tiroideas juegan un papel muy importante en la maduración de los

sistemas catecolaminérgicos diencefálicos.

- 7) La extirpación del tiroides influye poco sobre el contenido de ambas catecolaminas en el resto del cerebro.
- 8) Las hormonas ováricas parecen regular la biosíntesis o el metabolismo de la DA y de la NA, bien directamente o a través de las hormonas hipofisarias, ya que la ovariectomía produce un incremento muy acusado de ambas catecolaminas a lo largo de todo el desarrollo postnatal. Los niveles de NA, a diferencia de los controles, no se estabilizan a los 45 días sino que continúan aumentando hasta los 60 días de edad.
- 9) La extirpación de los ovarios no altera significativamente los niveles de ambas catecolaminas en el resto del cerebro.
- 10) La orquidectomía provoca también un aumento acusado de la DA diencefálica, pero a diferencia de lo que sucede en las hembras, después su concentración disminuye progresivamente y a los 60 días de edad se iguala con la de los controles. Se desconocen las causas responsables de esta normalización en ausencia de los andrógenos testiculares.
- 11) Así mismo, hay aumento de NA en el diencefalo tras la extirpación de los testículos; la evolución de sus concentraciones es paralela a la de los controles, pero a niveles más altos. También hay una clara diferencia con las hembras gonadectomizadas, en las que la NA diencefálica seguía aumentando durante el período 45-60 días.
- 12) Las concentraciones de ambas catecolaminas en el resto del cerebro de los machos castrados no se desvian significativamente de los controles.

- 1.- ADER, J.P., KORF, J. (1.979)  
J. Neurochem., 32, 1761
- 2.- ADER, J.P., SEBENS, J.B., KORF, J. (1.980)  
Psychopharmacology, 70, 239
- 3.- ADVIS, J.P., McCANN, S.M., NEGRO-VILAR, A. (1.980)  
Endocrinology, 107, 892
- 4.- AGHAJANIAN, G.K., BLOOM, F.E. (1.967)  
Brain Res, 6, 716
- 5.- AGHAJANIAN, G.K., BUNNEY, B.S. (1.974)  
Biochem. Pharmac. 23 suppl. 1, 457
- 6.- AGRAWAL, H.C., GLISSON, S.N., HIMMWICK, W.A. (1.966)  
Biochem. Biophys. Acta, 130, 511
- 7.- AHLENIUS, (1.974)  
Thesis, Göteborg
- 8.- ANDEN, N.E., ROOS, B.E., WERDINIUS, B. (1.964)  
Life Sci., 3, 149
- 9.- ANDEN, N.E., RUBENSON, A., FUXE, K., HOKFELT, T (1.967)  
J. Pharm. Pharmac. 19, 627
- 10.- ANDEN, N.E., FUXE, K. (1.971)  
J. Pharmacol., 43, 747
- 11.- ANDEN, N.E., STOCK, G. (1.973)  
J. Pharm. Pharmac., 25, 346
- 12.- ANDEN, N.E. (1.974)  
J. Pharm. Pharmac., 26, 738
- 13.- ANDEN, N.E. (1.974)  
J. Psychiat. Res., 11, 57

- 14.- ANI, M., BUTTERWORTH, P.J., THOMAS, P.J. (1.980)  
Brain Res. 183, 341
- 15.- ANTON, A.H., SAYRE, D.F. (1.964)  
J. Pharmacol. Exptl. Therap., 145, 326
- 16.- ANTON-TAY, F., WURTMAN, R.J. (1.968)  
Science, 159, 1245
- 17.- ANTON-TAY, F., PELHAM, R.W.; WURTMAN, R.J. (1.969)  
Endocrinology, 84, 1489
- 18.- ATKINSON, E.R.; BULLOCK, F.J.; GRANCHELLI, F.E.; ARCHER, S.; ROSENBERG, E.J.; TEIGER, D.J.; NACHOD, F.C. (1.975)  
Med. Chem., 18, 1000
- 19.- AWAZI, N.; GULDBERG, H.C. (1.978)  
Archiv. Pharmacol., 303, 63
- 20.- AXELROD, J. (1.971)  
Neurosci.Res. Prog. Bull., 9, 189
- 21.- AXELROD, J. (1.972)  
Pharmacol. Rev., 24, 233
- 22.- BALAZS, R.; KOVACS, S; TEICH-GRABER, P; COCKS, W.A. EARYS, J.T. (1.968)  
J. Neurochem., 15, 1335
- 23.- BALAZS, R.; KOVACS, S.; COCKS, W.A.; JOHNSON, A.L. EARYS, J.T. (1.971)  
Brain Res., 25, 555
- 24.- BALAZS, R.; PATEL, A.J.; HAJOS, F. (1.975)  
Psychoneuroendocrinology, 1, 25
- 25.- BARDIN, C.W. (1.980)  
Neuroendocrinology, 239



- 26.- BARRY; J.; DUBOIS, M.P.; POULAIN, P. (1.973)  
Z. Zellforsch, 146, 351
- 27.- BARRY, J. (1.979)  
Rev. Cytol., 60, 179
- 28.- BASSIRI, R.M.; UTIGER, R.D. (1.974)  
Endocrinology, 94, 188
- 29.- BARTHOLINI, G.; KELLER, H.H.; PLETSCHER, A. (1.973)  
Neuropharmacol., 12, 751
- 30.- BARTHOLINI, G. (1.976)  
J. Pharm. Pharmac. 28, 429
- 31.- BAKER, B.L.; DERMODY, W.C.; REEL, J.R. (1.975)  
Endocrinology, 97, 125
- 32.- BAUM, M.J.; VREEBURG, J.T.M. (1.973)  
Science, 182, 283
- 33.- BAUM, M.J.; STARR, M.S. (1.980)  
Pharmacol. Biochem. Behav., 13, 55
- 34.- BEATTIE, C.W.; RODGERS, C.H.; SOYKA, L.F. (1.972)  
Endocrinology, 91, 276
- 35.- BEN-ARI, Y.; ZIGMOND, R.E.; MOORE, K.E. (1.975)  
Brain Res., 87, 96
- 36.- BENKERT, O. (1.969)  
Life Sci., 8, 943
- 37.- BENKERT, O.; KOHLER, B. (1.972)  
Psychopharmacology, 24, 318
- 38.- BERGER, B.; TASSIN, J.P.; BLANC, G.; HOYNE, M.A.; THIERRY,  
A. M. (1.974)  
Brain Res., 81, 332

- 39.- BERRIDGE, T.L.; SHARMAN, D.F. (1.974)  
Brit. J. Pharmacol., 50, 156
- 40.- BERTLER, A.; CARLSSON, A.; ROSENGREN, E. (1.958)  
Acta Physiol. Scand., 44, 273
- 41.- BERTLER, A.; ROSENGREN, E. (1.959)  
Acta Physiol. Scand., 47, 350
- 42.- BEYER, C.; JAFFE, R.B.; GAY, V.L. (1.972)  
Endocrinology, 91, 1372
- 43.- BHATTACHARYA, A.N.; MARKS, B.H. (1.969)  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 130, 1194
- 44.- BHATTACHARYA, A.N.; DIERSCHKE, D.J.; YAMAJI, T.; KNOBIL, E. (1.972)  
Endocrinology, 90, 778
- 45.- BITENSKY, M.W.; RUSSELL, V.; BLANCO, M. (1.970)  
Endocrinology, 86, 154
- 46.- BJORKLUND, A.; MOORE, R.Y.; NOBIN, A.; STENEVI, U. (1.973)  
Brain Res., 51, 171
- 47.- BJORKLUND, A.; NOBIN, A. (1.973)  
Brain Res., 51, 193
- 48.- BJORKLUND, A.; WINDVALL, O.; NOBIN, A. (1.975)  
Brain Res., 89, 29
- 49.- BLAKE, C.A.; NORMAN, R.L.; SAWYER, C.H. (1.974)  
Neuroendocrinology, 16, 22
- 50.- BLIGH, J. (1.979)  
Neuroscience, 4, 1213
- 51.- BLISS, E.L.; AILION, J.; ZWANZIGER, J. (1.968)  
J. Pharmacol., 164, 122

- 52.- BLUMBERG, J.B.; TAYLOR, R.E.; SULSER, F. (1.975)  
J. Pharm. Pharmac., 27, 125
- 53.- BLUMBERG, J.B.; VETULANI, J.; STAWARZ, R.J.; SULSER, F  
(1.976)  
Europ.J. Pharmacol., 37, 357
- 54.- BOGDANSKI, D.I.; PLETSCHER, A.; BRODIE, B.B.; UNDEFRIEND,  
S. (1.956)  
J. Pharmacol., Exp. Ther., 117, 82
- 55.- BORRELL, J.; PIVA, F.; MARTINI, L. (1.979)  
Acta Endocrinol, 90, 385
- 56.- BOWER, M.B.; ROZITIS, A. (1.974)  
J. Pharm. Pharmac., 26, 743
- 57.- BOWERS, C.; FRIESEN, H.G.; HWANG, P.; GUYDA, H.J.,  
FOLKERS, K. (1.971)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, 1033
- 58.- BREESE, G.R.; TRAYLOR, T.D. (1.972)  
Br. J. Pharmac., 44, 210
- 59.- BROGMAN, R.J.; McPHILLIS, J.J.; STITZL, R.E. (1.973)  
J. Med. Chem., 16, 630
- 60.- BROWN, KRIGSTEIN, DANKOVAY, HORNYKIEWICZ (1.975)  
Neuroendocrinología. Ed. Toray, 95
- 61.- BROWNSTEIN, M.; SAAVEDRA, J.M.; PALKOVITS, M. (1.974)  
Brain Res., 79, 431
- 62.- BUCCAFUSCO, J.J.; BREZENOFF, H.E. (1.977)  
Neuropharmacol., 16, 775
- 63.- BUNNEY, B.S.; WALTERS, J.R.; ROTH, R.H.; AGHJANIAN, G.K.  
(1.973)  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 185, 560

- 64.- BURKI, H.R.; RUCH, N.; ASPER, H. (1.975)  
Psychopharmacology, 41, 27
- 65.- BUCKINGHAM, J.C.; HODGES, J.R. (1.974)  
J. Endocrinology, 62, 213
- 66.- BUTCHER, R.L.; COLLINS, W.E.; FUGO, N.W. (1.971)  
Endocrinology, 94, 1704
- 67.- CANNON, J.G.; O'DONNELL, J.P.; LEE, T.; HOPPIN, C.R.  
(1.975)  
J. Med. Chem., 18, 1212
- 68.- CARBALLEIRA, A.; FISHMAN, L.M. (1.980)  
Perspectives Biol. Med., 23 nº 4, 573
- 69.- CARLSSON, A.; WALDECK, B. (1.958)  
Acta Physiol. Scand., 44, 293
- 70.- CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T.; WALDECK, B.  
(1.958)  
Science, 127, 471
- 71.- CARLSSON, A.; LINDQUIST, M. (1.963)  
Acta Pharmac. Tox., 20, 140
- 72.- CARLSSON, A.; LINDQVIST, M. (1.972)  
J. Neural Transm., 33, 23
- 73.- CARLSSON, A. (1.978)  
Psychopharmacology. Raven Press, New York.
- 74.- CARR, L.A.; CONWAY, P.M.; VOOGT, J.L. (1.975)  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 192, 15
- 75.- CARROLL, B.J.; MENDELS, J. (1.976)  
Hormons, behavior and psychopathology (Ed. Sachar, E.J.)  
193, (Raven, New York)

- 76.- CASTAIGNE, P.; LAPLANE, D.; DORDIAN, G. (1.971)  
Res. Commun. Chem. Path. Pharmac., 2, 154
- 77.- CHAPPEL, S.C.; BARRACLOUGH, A. (1.976)  
Endocrinology, 98, 927
- 78.- CHIOCCIO, S.R.; NEGRO-VILAR, A.; TRAMEZANI, J.H. (1.976)  
Endocrinology, 99, 629
- 79.- CHANGEUX, J.P. (1.966)  
Molec. Pharmac., 2, 369
- 80.- CHANGEUX, J.P.; PODLESKI, T.R. (1.968)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 59, 944
- 81.- CLEMENT-CORMIER, Y.C.; KEBABIAN, J.W.; PETZOLD, G.L.;  
GREENGARD, P. (1.974)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 1113
- 82.- CLOUTIER, G.; WEINER, N. (1.973)  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 186, 75
- 83.- CODINA PUIGGROSS, A. (1.970)  
Medicina clínica, 54, 56
- 84.- COPPEN, A. (1.967)  
Brit. J. Psychiat., 113, 1237
- 85.- CORRODI, H.; FUXE, K.; HOKFELD, T. (1.968)  
Life Sci., 7, 107
- 86.- CORRODI, H.; FUXE, K.; HAMBERGER, B.; LJUNDAHL, A.  
(1.970)  
Europ. J. Pharmacol., 12, 145
- 87.- COSTALL, B. NAYLOR, R.J. (1.974)  
Europ. J. Pharmacol., 27, 46

- 88.- COSTALL, B.; NAYLOR, R.J.; PINDER, R.M. (1.974)  
J. Pharm. Pharmac., 26, 753
- 89.- COSTALL, B.; NAYLOR, R.J.; PINDER, R.M. (1.975)  
Europ. J. Pharmacol., 31, 94
- 8 90.- COTZIAS, G.C.; PAPAVALILIOU, P.S.; FEHLING, C.; KAUFMAN,  
B, MENA, E. (1.970)  
New Engl. J. Med., 282, 31
- 91.- COTZIAS, G.C. (1.972)  
Abstracts, 13th Medicinal Chemistry Symposium, Iowa City,  
Iowa, 91
- 92.- COYLE, J.T.; AXELROD, J. (1.971)  
J. Neurochem., 18, 2061
- 93.- COYLE, J.T.; AXELROD, J. (1.972a)  
J. Neurochem., 19, 449
- 94.- COYLE, J.T.; AXELROD, J. (1.972b)  
J. Neurochem., 19, 1117
- 95.- COYLE, J.T.; HENRY, D. (1.973)  
J. Neurochem., 21, 61
- 96.- CROWAND; T.J.; GILLBLE, G. (1.973)  
Nature, Lond., 245, 27
- 97.- CROWLEY, W.R. (1.982)  
Neuroendocrinology, 34, 381
- 98.- CROWLEY, W.R.; O'DONOHUE, T.L.; WASCHLICHT, H.; JACOBO-  
WITZ, D.M. (1.978a)  
Brain Res., 154, 345
- 99.- CROWLEY, W.R.; O'DONOHUE, T.L.; JACOBOWITZ, D.M. (1.978b)  
Acta Endocrinol., 89, 20

- 100.- CURZON, G.; GREEN, A.R. (1.971)  
British. J. Pharm., 43, 39
- 101.- DAHLSTRÖM, A.; FUXE, K. (1.964)  
Acta Physiol. Scand., 62 (suppl 232), 1
- 102.- DAHLSTRÖM, A.; FUXE, K. (1.965)  
Acta Physiol. Scand., 64 (suppl. 247), 1
- 103.- DALEY, S.; COTZIAS, G.C.; STECK, A.; PAPAVALILIOV, P.S.  
(1.971)  
Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 30, 216
- 104.- DALLMAN, M.F.; JONES, M.T.; VERNIKOS-DAWELIS, A.; GANONG,  
W.F. (1.972)  
Endocrinology, 91, 961
- 105.- D'ANGELO, A. (1.969)  
Endocrinology, 84, 632
- 106.- DAVIDSON, J.M.; SAWYER, C.H. (1.961)  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 107, 4
- 107.- DAVIDSON, J.M. (1.966)  
Neuroendocrinology, Martini L. Ganong W.F. (editors)  
565 pp. Academic Press, New York
- 108.- DEBELJUK, L.; ARIMURA, A.; SCHALLY, A.V. (1.972)  
Endocrinology, 90, 1578
- 109.- DEMAREST, K.T.; MCKAY, D.W.; RIEGLE, G.D.; MOORE, K.E.  
(1.981)  
Neuroendocrinology, 32, 108
- 110.- DE PAOLO, L.V.; OJEDA, S.R.; NEGRO-VILAR, A.; MCCANN, M.  
(1.982)  
Endocrinology, 110 nº 6, 1999

- 111.- DE SCHAEPPDRYVER, A.F.; PREZIOZI, P.; SCAPAGNINI, U.  
(1.969)  
Arch. Int. Pharmacodyn., 180, 11
- 112.- DESSERT-NIEST, J. (1.976)  
Osterr. Z. Oncol., 3, 70
- 113.- DONOSO, A.O.; STEFANO, F.J.; BISCARDI, A.M.; CUKIER,  
J. (1.967)  
Am. J. Physiol., 212, 737
- 114.- DONOSO, A.O.; GUTIERREZ MOYANO, M.B. (1.970)  
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 135, 663
- 115.- DONOSO, A.O. (1.975)  
Neuroendocrinología. Ed. Toray, 75
- 116.- DUBY, S.E.; COTZLAS, G.C.; PAPAVALILIOU, P.S.; LAWRENCE,  
W.H. (1.972)  
Arch. Neurol., 27, 474
- 117.- EHRINGER, H.; HORNYKIEWICZ, O. (1.960)  
Klin. Wschr., 38, 1236
- 118.- EIDELBERG, E.; WOODBURY, C.M. (1.972)  
The neurobiology of the amigdala. Eleftheriov B.E. (ed.)  
Plenum Press, New York 609
- 119.- ENDROCZI, E.; SCHREIBERG, G.; LISSAK, K (1.963)  
Acta Physiol. Hung., 24, 211
- 120.- ENDROCZI, E.; HRASCHEK, A.; NYAKAS, C.; SZABO, G.  
(1.976)  
Endokrinologie, 68 (1), 51
- 121.- ENGSTROM, G.; SVENSSON, T.H.; WALDECK, B. (1.974)  
Brain Res., 77, 471



- 122.- EPSTEIN, Y.; LUNENFELD, B.; KRAIEM, Z. (1.977)  
Acta Endocr. Copenh., 86, 728
- 123.- ERNST, A.M.; SMELIK, P.G. (1.966)  
Experientia, 22, 837
- 124.- EULER, V.S. (1.956)  
Noradrenalina.(Sprinfield, 111, C.C. Thomas)
- 125.- EVERITT, B.J.; FUXE, K.; HOKFELT, F.T.; JONSSON, G.  
(1.975)  
J. Comp. Physiol. Psychol., 89, 556
- 126.- EXTON, J.H. (1.972)  
J. Biol. Chem., 247, 3579
- 127.- FEDER, H.H.; NAFTOLIN, F.; RYAN, K.J. (1.974)  
Endocrinology, 94, 136
- 128.- FELDMAN, S.; CONFORTI, N. (1.980)  
Hormone Res., 12, 289
- 129.- FIBIGER, H.C.; LYTLE, L.D.; CAMPBELL, B.A. (1.970)  
J. Comp. Physiol. Psychol., 72, 384
- 130.- FLEMING, R.M.; CLARK, W.G.; FENSTER, E.D.; TOWNE, J.E.  
(1.965)  
Anal. Chem., 37, 692
- 131.- FROHMAN, L.A. (1.980)  
Neuroendocrinology, 44. (Krieger, D.; Hughes, J. eds)  
EEUU.
- 132.- FUJIEDA, K.; FAIMAN, C.; REYES, F.I.; THLIVERIS, J.;  
WINTERS, J. (1.981)  
J. clin.Endocrinol. Metab., 53 nº 2, 401
- 133.- FUXE, K.; GUNNE, L.M. (1.964)  
Acta Physiol. Scand., 62, 493

- 134.- FUXE, K. (1.965)  
Acta Physiol. Scand., 64 (suppl. 247), 37
- 135.- FUXE, K.; HÖKFELT, T.; NILSSON, O. (1.965)  
Am. J. Anat., 117, 33
- 136.- FUXE, K.; HÖKFELT, T. (1.966)  
Acta Physiol. Scand., 66, 245
- 137.- FUXE, K.; HOKFELT, T.; NILSSON, O. (1.969)  
Neuroendocrinology, 5, 107
- 138.- FUXE, K.; HOKFELT, T.; JONSSON, G.; LIDBRINK, P. (1.973b)  
Hormones and Brain function (K. Lissak Ed.), 409,  
Plenum Press, New York
- 139.- FUXE, K.; HOKFELT, T.; JONSSON, G.; LEVINE, F., LID-  
BRINK, P.; LOFSTROM, A. (1.973a)  
Brain-pituitary-adrenal interrelationship (Brodish &  
Redgate, E.S. Eds.), 239, Karger, Basel
- 140.- FUXE, K.; HÖKFELT, T.; JOHANSSON, O.; JONSSON, G.,  
LIDBRINK, P.; LJUNGDAHS, A. (1.974)  
Brain Res., 82, 349
- 141.- GALLO, R.V. (1.980)  
Neuroendocrinology, 30, 122
- 142.- GANONG, W.F. (1.967)  
Milit. Med., 132, 360
- 143.- GANONG, W.F. (1.972)  
Excerpta. Med. Int. Congr. Ser., 219, 814
- 144.- GANONG, W.F. (1.973)  
Frontiers in Catecholamine Research. (Usdin, L.E. and  
Snyder, S.H. Eds.), 819. Pergamon Press, New York

- 145.- GANONG, W.F. (1.974)  
Neurosciences: Third Study Program (Schmitt, F.O. and  
Worden, F.G. Eds.), 549, The Mit Press, Cambridge, Mass
- 146.- GAUNT, R.; GISOLDI, N.S.; STEINEZ, B.G.; CHARF, J.J.  
(1.970)  
Endocrinology, 87, 1088
- 147.- GAY, V.L.; MIDGLEY, A.R.; NISWENDER, G.D. (1.970)  
Fed. Proc., 29, 1880
- 148.- GELOSO, J.P.; HEMON, P.; LEGRAND, J.; LEGRAND, C.;  
JOST, A. (1.968)  
Gen. Comp. Endocr., 10, 191
- 149.- GESSA, G.L.; BIGGIO, G.; VARGIU, L.; NAPOLEONE, F.;  
TAGLIAMONTE, A. (1.974)  
Experientia, 30, 1295
- 150.- GINOS, J.G.; COTZIAS, G.C.; TOLOSA, E.; TANG, L.C.;  
LOMONTE, A. (1.975)  
J. Med. Chem., 18, 1194
- 151.- GITLOW, S.E.; MENDLOWITZ, M.; BERTANI, L.M. (1.970)  
Am. J. Cardiol., 26, 270
- 152.- GLOWINSKI, J.; IVERSEN, L.L. (1.966)  
J. Neurochem., 13, 655
- 153.- GLOWINSKI, J.; THIERRY, A.M.; BLANC, G.; SOBEL, A.;  
STINUS, S.L. (1.973)  
Science, 182, 499
- 154.- GLOWINSKI, J.; THIERRY, A.M.; BLANC, G.; HIRSCH, J.C.;  
TASSIN, J.P. (1.974)  
Brain Res., 79, 77
- 155.- GOLDBERG, L.I.; SONNEVILLE, P.F.; McNAY, J.L. (1.968)  
J. Pharmac. exp. Ther., 163, 188

- 156.- GOLDBERG, L.I. (1.974)  
New. Engl. J. Med., 291, 707
- 157.- GOLDSTEIN, M.; NAKAJIMA, K. (1.967)  
J. Pharmac. Exp. Ther., 157, 96
- 158.- GOODMAN, R.L.; KNOBIL, E. (1.981)  
Neuroendocrinology, 32, 57
- 159.- GORDON, J.H.; GORSKI, R.A.; BORISON, R.L.; DIAMOND, B.I.  
(1.980)  
Pharmacol. Biochem. Behav., 12, 515
- 160.- GORDON, J.H.; DIAMOND, B.I. (1.981)  
Biol. Psychiat., 16 n° 4, 365
- 161.- GORSKI, R.A. (1.973)  
Frontiers in Neuroendocrinology, 2 (Martini, L. and Ganong, W.F. Eds.), 237. Oxford University Press, New York
- 162.- GORSKI, R.A. (1.980)  
Neuroendocrinology, (Krieger, D. and Hughes, J. Eds)  
EEUU.
- 163.- GRAGG, B.G. (1.970)  
Brain Res, 18, 297
- 164.- GREENGRASS, P.M.; TONGE, S.R. (1.975)  
Archiv. Int. Pharmacodyn., 214, 46
- 165.- GRIMM, Y.; REICHLIN, S. (1.973)  
Endocrinology, 93, 626
- 166.- GRUMBACH, M.M. (1.980)  
Neuroendocrinology, (Krieger, D. and Hughes, J, Eds.),  
249, EEUU
- 167.- GUDELSKY, G.A.; MCCALL, R.B.; CHINEH, C.C.; MOORE, K.E.  
(1.974)

Chem. Path. Pharmac., 19 nº 4, 653

- 168.- GUDELSKY, G.A.; ANNUNZIATO, L.; MOORE, K.E. (1.977)  
Endocrinology, 101, 1894
- 169.- HABEL, A.; YATES, C.M.; McQUEEN, J.K.; BALCKWOOD, D.;  
ELTON, R.A. (1.981)  
Neurology, 31, 488
- 170.- HADFIELD, M.G.; MOTT, D.E.W.; ISMAY, J.A. (1.980)  
Biochem. Pharmac., 29, 1861
- 171.- HALL, M.M.; MARKS, B.H. (1.970)  
Fed. Proc., 29, 311
- 172.- HARLAN, R.E.; GORDON, J.H.; GORSKI, R.A. (1.979)  
Reviews of Neuroscience, 4 (Schneider Ed.), 31. Raven  
Press, New York
- 173.- HARMS, P.G.; OJEDA, S.R.; McCANN, S.M. (1.976)  
Endocrinology, 98, 318
- 174.- HARY, L.; DUPON, J.P.; CHATELAIN, A. (1.981)  
Biology of the Neonate, 39, 28
- 175.- HEDNER, T.; LUNDBORG, P. (1.980)  
Transmission, 49, 257
- 176.- HEDNER, T.; LUNDBORG, P. (1.981)  
Medical Biology, 59, 212
- 177.- HENNING, M. (1.975)  
Clin. Sci. Mol. Sci., 48, 1955
- 178.- HERMAN, Z.S. (1.970)  
Psychopharmacologia (Berl.), 16, 369
- 179.- HILLARP, N.A.; FUXE, K.; DAHLSTROM, A. (1.966)  
Pharmacol. Rev., 18, 727

- 180.- HOHN, K.G.; WUTTKE, N. (1.978)  
Brain Res., 156, 241
- 181.- HOHN, K.G.; WUTTKE, N. (1.979)  
Brain Res., 179, 281
- 182.- HOKFELT, T.; FUXE, K. (1.972)  
Neuroendocrinology, 9, 100
- 183.- HONMA, K.; WUTTKE, N. (1.980)  
Endocrinology, 106, 1848
- 184.- HORN, A.S.; QUELLO, A.C.; MILLER, R.J. (1.974)  
J. Neurochem., 22, 265
- 185.- HORN, A.S.; PHILLIPSON, O.T. (1.976)  
Europ. J. Pharmacol., 37, 1
- 186.- HORNYKIEWICZ, O. (1.973)  
Br. Med. Bull., 29, 172
- 187.- HRDINA, P.D.; GHOSH, P.K.; RASTOGI, R.E.; SINGHAL, R.L.  
(1.975)  
Can. J. Physiol. Pharmacol., 53 n° 5, 709
- 188.- HRUSKA, R.E.; SILBERGELD, E.K. (1.980)  
Europ. J. Pharmacol., 61, 397
- 189.- HUFF, R.M.; ADAMS, R.N. (1.980)  
Neuropharmacol., 19, 587
- 190.- HYTTEL, J. (1.975)  
J. Neurochem., 25, 681
- 191.- IKEDA, M.; FAHIEN, L.A.; UDENFRIEND, S.A. (1.966)  
J. Biol. Chem., 241, 4452
- 192.- ITO, M.; OKUNO, T.; MIKAWA, H.; OSUMI, Y. (1.980)  
Epilepsia, 21, 387

- 193.- IVERSEN, L.L. (1.967)  
The uptake and Storage of Noradrenaline in Sympathetic  
nerves. The University Press, Cambridge.
- 194.- IVERSEN, L.L.; SIMMONDS, M.A. (1.969)  
J. Physiol., 204, 229
- 195.- IVERSEN, L.L.; HORN, A.S.; MILLER, R.J. (1.975)  
Pre and Postsynaptic Receptors (Usdin and Bunney, W.E.  
Eds.), 207 New York
- 196.- IVERSEN, L.L. (1.975)  
Science, 183, 1084
- 197.- IVERSEN, L.L. (1.980)  
El cerebro (Ed. Labor), 85. Barcelona
- 198.- JACKSON, I.M.D.; GAGEL, R.; PAPAPETRON, P.; REICHLIN, S.  
(1.974)  
Clin. Res., 22, 342A
- 199.- JACKSON, D.M.; AHLENIUS, S.; ANDEN, N.E.; ENGEL, J.  
(1.977)  
J. Neural Transm., 41, 231
- 200.- JACOBS, L.S.; SNYDER, P.J.; WILBUR, J.F.; UTIGER, R.D.;  
DAUGHADAY, W.H. (1.971)  
J. Clin. Endocr., 33, 996
- 201.- JACOBS, L.S.; SNYDER, P.J.; UTIGER, R.D.; DAUGHADAY,  
W.H. (1.973)  
J. Clin. Endocr., 36, 1069
- 202.- JANSSEN, P.A.J. (1.965)  
Int. Rev. Neurobiol., 8, 221
- 203.- JANSSEN, P.A.J.; NIEMEGEREERS, C.J.E.; SCHELLEKENS, K.H.  
Drug. Res., 15, 104

- 204.- JANSSEN, P.A.J.; NIEMEGEERS, C.J.E.; SCHELLEKENS, K.H.  
(1.966)  
Drug Res., 16, 339
- 205.- JANSSEN, P.A.J.; NIEMEGEERS, C.J.E.; SCHELLEKENS, K.H.  
LENAERTS, F.M. (1.967)  
Drug Res., 17, 841
- 206.- JARA, A. (1.976)  
Medicine. Enf. Endocrinas II. 1ª serie, 19
- 207.- JAVOY, F.; GLOWINSKI, J.; KORDON, C. (1.968)  
Europ. J. Pharmacol., 4, 103
- 208.- JENNES, L.; BECKMAN, W.C.; STUMPF, W.E.; GRZANNA, R.  
(1.982)  
Exp. Brain Res., 46, 331
- 209.- JONES, M.T. (1.978)  
The Endocrine Hypothalamus (Jeffcoate, S.L. and Hutchinson, J.S.M. Eds.), 385. Academic Press, New York
- 210.- JONSSON, G.; FUXE, K.; HÖKFELT, T. (1.972)  
Brain Res., 40, 271
- 211.- KALRA, S.P.; AJIKA, K.; KRULICH, L.; FAWCETT, C.P.;  
QUIJADA, M.; McCANN, S.M. (1.971).  
Endocrinology, 88, 1150
- 212.- KALRA, S.P.; McCANN, S.M. (1.973)  
Progr. Brain Res., 9, 185
- 213.- KALRA, S.P.; KALRA, P.S.; CHEN, C.L.; CLEMENS, J.A.  
(1.978)  
Acta Endocr. Copenh., 89, 1
- 214.- KAMBERI, I.A.; MICAL, R.S.; PORTER, J.C. (1.970)  
Endocrinology, 87, 1



- 215.- KAMBERI, I.A. (1.973)  
Progr. Brain Res., 39, 261
- 216.- KARLIN, A. (1.967)  
J. Theor. Biol., 16, 306
- 217.- KAROBATH, M.; LEITICH, H. (1.974)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 2915
- 218.- KARTESZI, M.; PALKOVITS, M.; KISS, J.Z.; KANYICSKA, B.;  
FEKETE, M.I.K.; STARK, E. (1.981)  
Neuroendocrinology, 32, 7
- 219.- KASTIN, A.J.; EHRENSING, R.H.; SCHALCH, D.S.; ANDERSON,  
M.S. (1.972)  
Lancet, ii, 740
- 220.- KAUFMAN, S. (1.974)  
Aromatic Amino Acids in the Brain (Wolstenholme Ed.), 85
- 221.- KAWA, A.; KAMISAKI, T.; ARIYAMA, T.; MAEDA, Y.; KANE-  
HISA, T. (1.977)  
IRCS Medical Science: Endocrine System, Nervous System,  
Pharmacology, Physiology, 5, 449
- 222.- KEBABIAN, J.W.; CALNE, D.B. (1.979)  
Nature, 277, 93
- 223.- KEBANIAN, J.W.; PETZOLD, G.L.; GREENGARD, P. (1.972)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2145
- 224.- KELLER, P.J.; LICHTENSTEIGER, W. (1.971)  
J. Physiol., 219, 385
- 225.- KELLER, H.H.; BARTHOLINI, G.; PLETSCHER, A. (1.973)  
Europ. J. Pharmacol., 23, 183
- 226.- KELLER, H.H.; BARTHOLINI, G.; PLETSCHER, A. (1.974)  
Nature Lond., 248, 528

- 227.- KELLOGG, C.; WENNESTROM, G. (1.974)  
Brain Res., 79, 451
- 228.- KENDALL, J.W. (1.971)  
Martini Frontiers in Neuroendocrinology, 177 Oxford  
University Press, Oxford
- 229.- KETY, S.R. (1.980)  
El cerebro (Ed. Labor), 170. Barcelona
- 230.- KINGSLEY, T.R.; BOGDANOVE, E.M. (1.973)  
Endocrinology, 93, 1398
- 231.- KIZER, J.S.; PALKOVITS, J.; ZIVIN, J.; BROWNSTEIN, M.;  
SAAVEDRA, J.M.; KOPIN, I.J. (1.974)  
Endocrinology, 95, 799
- 232.- KIZER, J.S.; PALKOVITS, M.; KOPIN, I.J.; SAAVEDRA, J.M  
BROWNSTEIN, M.J. (1.976)  
Endocrinology, 98, 743
- 233.- KIZER, J.S.; HUMM, J.; NICHOLSON, G.; GREELEY, G.;  
YOUNG-BLOOD, W. (1.978)  
Brain Res., 146, 95
- 234.- KNIGHT, J.A.; HAYMOND, R.E. (1.977)  
Clin. Chem., 23, 11
- 235.- KOJIMA; m.; KIM, J.S.; UCHIMURA, H.; HIRANO, M.; NAKA-  
HARA, T.; MATSUMOTO, T. (1.981)  
Brain Res., 209, 227
- 236.- KOPIN, I.J. (1.980)  
Neuroendocrinology. (Krieger, D and Hughes, J. Eds.),  
159. EEUU.
- 237.- KORDON, C.; GLOWINSKI, J. (1.972)  
Neuropharmacol , 11, 153

- 238.- KOSLOW, S.J.; SCHLUMPF, M. (1.974)  
Nature Lond., 259, 530
- 239.- KRANTZ, J.C.; CARR, C.J. (1.969)  
Pharmacological Principles of Medicinal Practice. (Williams and Wilkins Eds.), 143, Baltimore Md.
- 240.- KRIEG, R.J.; SAWYER, C.H. (1.976)  
Endocrinology, 99, 411
- 241.- KRIEGER, H.P.; KOLODNY, H.; KRIEGER, D.T. (1.964)  
Fed. Proc., 23, 205
- 242.- KRIEGER, D.T.; SILVERBERD, A.T.; RIZZO, F., KRIEGER, H.P. (1.968)  
Am. J. Physiol., 215, 959
- 243.- KRIEGER, D.T.; RIZZO, F. (1.969)  
Am. J. Physiol., 217, 1703
- 244.- KRIEGER, D.T. (1.980)  
Neuroendocrinology. (Krieger, D and Hughes, J. Eds), 1, EEUU.
- 245.- KRUEGER, B.K.; FORM, J.; GREENGARD, P. (1.975)  
Pre and Postsynaptic Receptors. (Usdin, E. and Bunney W.E. ), 123. New York
- 246.- KUMAKURA, K.; HOFFMAN, M.; COCCHI, D.; TRABUCCHI, M. SPANO, P.F.; MULLER, Z.Z. (1.979)  
Psychopharmacology, 61, 13
- 247.- KUMAR, N.; JAIN, P.C. (1.977)  
Progr. Res., 21, 409
- 248.- LABORIT, H.; THURET, F. (1.977)  
Agressologie, 18, 2

- 249.-LAMMERS, H.J. (1.972)  
Neurobiology of the amigdala. (Eleftheriov, B.E. Eds)  
Plenum Press, New York
- 250.- LAMPRECHT, F.; COYLE, J.T. (1.972)  
Brain Res., 41, 503
- 251.- LARSSON, K.; SODERSTEN, P.; BEYER, C. (1.973)  
Hormones Behav., 4, 289
- 252.- LAVERTY, R.; TAYLOR, K.M. (1.968)  
Anal. Biochem., 22, 269
- 253.- LEELAVATHI, D.E.; MISRA, Ch.H.; SHELAT, H.; SMITH, R.C.  
(1.980)  
Psychopharmacology, 4, 417
- 254.-LEITZ, F.; BARILETTO, S.; DOLLAR, E. (1.971)  
The Pharmacologist, 13, 252
- 255.- LENGVARI, I.; BLANCH, B.; TAYLOR, A. (1.980)  
Developm. Neurosci., 3, 59
- 256.- LEONARD, B.E. (1.975)  
Z. Naturforsch., 30, 385
- 257.- LERAY, F.; CHAMBANT, A.M.; PERRENOND, M.L.; HANOUNE, J.  
(1.973)  
Eur. J. Biochem., 38, 185
- 258.- LERET, M.L.; OLID, J.M.; MARTINEZ-CONDE, E (1.983)  
Enviado al Comp. Biochem. Physiol.
- 259.- LERET, M.L.; OLID, J.M.; MARTINEZ-CONDE, E. (1.983)  
Enviado a la Rev. Esp. Fisiol.
- 260.- LEVITT, M.S.; SPECTOR, A.; SJOERDSMA, A.; UDENFRIEND, S  
(1.965)  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 148, 1

- 261.- LIBERTUN, C; LARREA, G.A.; VACAS, M.I.; CARDINALI, D.  
P. (1.980)  
Endocrinology, 107, nº 6, 1905
- 262.- LINDVALL, O; BJORKLUND, A.; MOORE, R.; STENEVI, U.  
(1.974)  
Brain Res., 81, 325
- 263.- LOFSTROM, A.; JONSSON, G.; WIESEL, F.A.; FUXE, K.  
(1.976)  
J. Histochem. Cytochem., 24, 430
- 264.- LOFSTROM, A. (1.977)  
Brain Res., 120, 113
- 265.- LOFSTROM, A.; ENEROTH, P.; GUSTAFSSON, J.A.; SKETT,  
P. (1.977)  
Endocrinology, 101, 1559
- 266.- LOIZOU, L. (1.972)  
Brain Res., 40, 395
- 267.- LOTTI, V.J. (1.974)  
Life Sci., 10, 781
- 268.- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.  
J. (1.951)  
J. Biol. Chem., 193, 265
- 269.- LUNDBERG, D.; BREESE, G.R.; MUELLER, R.A. (1.979)  
Europ. J. Pharmacol., 54, 153
- 270.- MAEDA, T.; DRESSE, A. (1.969)  
Acta Neurol. Belg., 69, 5
- 271.- MARKS, B.H.; HALL, M.M.; BHATTACHARYA, A.N. (1.970)  
Progr. Brain Res., 32, 58

- 272.- MATTHYSE, S. (1.974)  
J. Psychiat. Res., 11, 107
- 273.- MATSUYANA, H.; MINUS, R.B. (1.971)  
Endocrinology, 88, 696
- 274.- MATSUZAKI, S. (1.970)  
Endocrinol. Japan, 17, 379
- 275.- McEWEN, B.S.; PTAFF, D.W.; ZIGMOND, R.E. (1.970)  
Brain Res., 21, 29
- 276.- McEWEN, B.S. (1.980)  
Neuroendocrinology. (Krieger, D and Hughes J. Eds), 33.  
EEUU
- 277.- McGEER, E.G.; FIBIGER, H.C.; WICKSON, V. (1.971)  
Brain Res., 32, 433
- 278.- McLENNAN, H. (1.963)  
Synaptic Transmission. (Philadelphia: W.D. Saunders)
- 279.- McMILLEN, B.A.; SHORE, P.A. (1.977)  
J. Pharm. Pharmac., 29, 780
- 280.- McMILLEN, B.A.; SHORE, P.A. (1.978)  
Europ. J. Pharmacol., 52, 225
- 281.- MICHAEL, R.P. (1.980)  
Neuroendocrinology. (Krieger, D. and Hughes, J. Eds), 223  
EEUU
- 282.- MILLER, R.J.; HORN, A.S.; IVERSEN, L.L. (1.974)  
Nature Lond. 250, 238
- 283.- MIMS, R.B. (1.973)  
Horm, Metab. Res., 5, 368
- 284.- MOBLEY, P.L.; SULSER, F. (1.980)  
Nature Lond., 286, 608

- 285.- MOLLER-NIELSEN, I.; PEDERSEN, V.; NYMARK, M.; FRANCK, K.F.; BOCK, U.; FJALLAN, B.; CRISTENSEN, A.V. (1.973)  
Acta Pharmac. Tox., 33, 353
- 286.- MONRREALE DE ESCOBAR, G.; JOLIN, T.; ESCOBAR DEL REY, F. (1.970)  
Actas de la Sociedad Endocrinológica de Madrid, 2, 229
- 287.- MOORE, K.E.; DEMAREST, K.T.; JOHNSTON, C.A. (1.980)  
Fed. Proc., 39, 2912
- 288.- MOTTA, M.; PIVA, F.; TIMA, L.; ZANISI, M.; MARTINI, L. (1.971)  
J. Neuro-Vis. Relat. Suppl X, 32
- 289.- MOTTA, M.; DANIELS, E.L.; MARTINI, L. (1.975)  
Endocr. exp., 9, 3
- 290.- MUELLER, G.P.; CHEN, H.J.; MEITES, J. (1.973)  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 144, 613
- 291.- MUNARO, N.I. (1.977)  
Acta Endocr. Copenh., 86, 235
- 292.- NAGATSU, T.; LEVITT, M.; UDENFRIEND, S. (1.964)  
J. Biol. Chem., 239, 2910
- 293.- NAGAYAMA, Y. (1.977)  
J. Clin. Endocr. Metab., 45, 215
- 294.- NAKAHARA, T.; UCHIMURA, H.; HIRANO, M.; SAITO, M.; ITO, M. (1.976)  
Brain Res., 117, 351
- 295.- NAKAHARA, T.; UCHIMURA, H.; HIRANO, M.; SAITO, M., KIM, J.S.; MATSUMOTO, T. (1.979)  
Brain Res., 179, 396

- 296.- NATHANSON, J.A.; GREENGARD, P. (1.980)  
El cerebro. (Ed. Labor), 98. Barcelona
- 297.- NAUMENKO, E.V.; SEROVA, L.I. (1.976)  
Brain Res., 110, 537
- 298.- NEILL, J.D. (1.974)  
Handbook of Physiology. 4 s.7 part. 2 (Knobil, E. and Sawyer, W.H. Eds.), 469. American Physiological Society. Washington
- 299.- NETTER, J.; WASSERMAN, W. (1.976)  
(R.D. Irwin, Inc) 6<sup>a</sup> Ed. Homewood, Illinois
- 300.- NEUMEYER, J.L.; MCCARTHY, M.; BATTISTA, S.P.; ROSENBERG, E.J.; TEIGER, D.G. (1.973)  
J. Med. Chem., 16, 1228
- 301.- NEUMEYER, J.L.; GRANCHELLI, F.E.; FUXE, K.; UNGERSTEDT, U.; CORRODI, H. (1.974)  
J. Med. Chem., 17, 1090
- 302.- NEUMEYER, J.L.; REINHARD, J.F.; DAFELDECKER, N.P.; GUARINO, J.; KOSERSKY, D.S. (1.976)  
J. Med. Chem., 19, 25
- 303.- NOBIN, A.; BJORKLUND, A. (1.975)  
Acta Physiol. Scand. Sppl 1, 388, 1
- 304.- NOMURA, Y.; NAITOH, F.; SEGAWA, T. (1.976)  
Brain Res., 101, 305
- 305.- NYBACK, H.; SEDVALL, G. (1.968)  
J. Pharmac. Exp. Ther., 162, 294
- 306.- OJEDA, S.R.; McCANN, S.M. (1.973)  
Neuroendocrinology, 12, 295



- 307.- OJEDA, S.R.; McCANN, S.M. (1.978)  
Current Studies in Hypothalamic function. Karger. Basal,  
106. (Lederis, K and Veale, W.L. Eds)
- 308.- OJEDA, S.R.; NAOR, Z; NEGRO-VILAR, A. (1.979)  
Prostaglandins Med., 5, 249
- 309.- OJEDA, S.R.; NEGRO-VILAR, A.; McCANN, S.M. (1.982)  
Endocrinology, 110 nº 2, 409
- 310.- OLSON, L.; SEIGER, A. (1.972)  
Anat. Entwickl. Gesch., 137, 301
- 311.- PALMER, G.C.; ROBINSON, G.A.; SULSER, F. (1.971)  
Biochem. Pharmac., 20, 236
- 312.- PALMER, G.C.; ROBINSON, G.A.; MANIAN, A.A.; SULSER, F.  
(1.972)  
Psychopharmacologia, 23, 201
- 313.- PALMER, G.C.; MANIAN, A.A. (1.974)  
Neuropharmacol., 13, 851
- 314.- PARVIZI, N.; ELSAESSER, F.; SMIDT, D.; ELLENDORFF, F.  
(1.977)  
Endocrinology, 101, 1078
- 315.- PARVIZI, N.; ELLENDORFF, F. (1.982)  
Neuroendocrinology, 35, 48
- 316.- PATEY, G.; DE LA BAUME, S.; GROSS, C.; SCHWARTZ, J.C.  
(1.980)  
Life Sci., 27, 245
- 317.- PATO CASTEL, I.; ALONSO RODRIGUEZ, C.; MARTINEZ VIVANCO,  
J., RODRIGUEZ POYO-GUERRERO, P. (1.981)  
Medicine, 1162

- 318.- PERT, C.B.; SNYDER, S.H. (1.975)  
Res. Prog. Bull., 13, 73
- 319.- PESETSKY, I. (1.973)  
Brain Res., 63, 456
- 320.- PFEIFER, K.A.; VIZI, E.S.; SATORY, E.; GALAMBOS, E.  
(1.963)  
Experientia, 19, 482
- 321.- PIJNENBURG, A.J.J.; HONING, W.M.M.; VAN ROSSUM, J.M.  
(1.975)  
Psychopharmacologia (Berl), 41, 175
- 322.- PINDER, R.M. (1.973)  
Adv. Neurol., 3, 295
- 323.- PINDER, R.M. (1.974)  
Prog. Med. Chem., 9, 191
- 324.- POHORECKY, L.A.; ZIGMOND, M.; KARTEN, H.; WURTMAN, R.J.  
(1.969)  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 165, 190
- 325.- PRANGE, A.J.; MEEK, J.L.; LIPTON, M.A. (1.970)  
Life Sci., 9, 901
- 326.- PRANGE, A.J.; WILSON, I.C.; LARA, P.P.; ALLTOP, L.B.;  
BREESE, G.R. (1.972)  
Lancet, ii, 999
- 327.- PTAFF, D.W. (1.968)  
Experientia, 24, 958
- 328.- RAISMAN, G.; FIELD, P.M. (1.971)  
Frontiers in Neuroendocrinology, 2 . (Martini, L and  
Ganong, W.F. Eds.) Oxford University Press. New York

- 329.- RAMIREZ, V.D.; McCANN, S.M. (1.965)  
Endocrinology, 76, 412
- 330.- RASTOGI, R.B.; SINGHAL, R.L. (1.974)  
Brain Res., 81, 253
- 331.- RASTOGI, R.B.; LAPIERRE, Y.; SINGHAL, R.L. (1.976)  
J. Neurochem., 26, 443
- 332.- RASTOGI, R.B.; SINGHAL, R.L. (1.977)  
J. Cell. Biol. (USA) 7s/2 II (109 A)
- 333.- RASTOGI, R.B.; SINGHAL, R.L. (1.978)  
Br. J. Pharmac., 62 (1), 131
- 334.- RASTOGI, R.B.; SINGHAL, R.L. (1.979)  
Psychopharmacology (Berlin), 25, 287
- 335.- REDMOND, Jr.; MURPHY, D.L.; BAULU, J.; ZIEGLER, M.G.;  
LAKE, C.R. (1.975)  
Psychosom. Med., 37 (5), 417
- 336.- REICHLIN, S. (1.967)  
Neuroendocrinology, 1 (Martini y Ganong, Eds.), 445,  
Academic Press. New York
- 337.- REYMOND, M.J.; PORTER, J.C. (1.981)  
Brain Res. Bull , 7, 69
- 338.- ROMMELSPACHER, H.; STRAUSS, S.M.; REHSE, K. (1.978)  
J. Neurochem., 30, 1573
- 339.- ROSS, E. (1.976)  
Medicine, 14, 84
- 340.- ROTSZTEJN, W.H.; CHARLI, J.L.; PATTOU, E.; KORDON, C.  
(1.977)  
Endocrinology, 101 nº 5, 1475

- 341.- SAARI, W.S.; KING, S.W.; LOTTI, V.J.; SCRIBABINE, A.  
(1.974)  
J. Med. Chem., 17, 1086
- 342.- SAAVEDRA, J.M.; PALKOVITS, M.; BROWNSTEN, M.J.; AXELROD,  
J. (1.974)  
Nature Lond., 248, 695
- 343.- SAR, M.; STUMPZ, W.E. (1.973)  
Endocrinology, 92, 251
- 344.- SAR, M.; STUMPZ, W.E. (1.981)  
Nature Lond., 289, 500
- 345.- SAVAGEAU, M.M.; BEATTY, W.W. (1.981)  
Pharmacol. Biochem. Behav., 14, 17
- 346.- SCATTON, B. (1.977)  
Europ. J. Pharmacol., 46, 363
- 347.- SCHALLY, A.V.; ARIMURA, A. (1.977)  
Clinical Neuroendocrinology. (Martini y Besser, G.M.  
Eds.) Academic Press, New York
- 348.- SCHEIBEL, M.E.; SCHEIBEL, A.B. (1.967)  
The Neurosciences. (Quarton, G.C.; Malnechuk, T, and  
Schmitt, F.O. Eds.) The Rockefeller Univ. Press. New  
York
- 349.- SCHILDKRAUT, J.J. (1.965)  
Am. J. Psychiat, 122, 509
- 350.- SCHILDKRAUT, J.; KETY, S. (1.967)  
Science, N.Y., 156, 21
- 351.- SEDVALL, G.; FYRO, B.; NYBACK, H.; FRITS-AXEL, W.  
(1.975)  
Adv. Neurol., 9, 131

- 352.- SETALO, G.; FLERKO, B. (1.978)  
Int. Rev. Cytol., 7, 1
- 353.- SHALABY, I.A.; DENDEL, P.S.; SPEAR, L.P. (1.981)  
Developm. Brain. Res., 1, 434
- 354.- SHEN, J.T.; GANONG, W.F. (1.976)  
J. Pharmacol. Exp l. Ther., 199 (3), 639
- 355.- SIDNEVA, L.N.; ADAMSKAIA, E.I. (1.975)  
Probl. Endokrinol., 21 (6), 84
- 356.- SIMPKINS, J.W.; KALRA, S.P. (1.979)  
Brain Res., 170, 475
- 357.- SIMPKINS, J.W.; KALRA, P.S.; KALRA, S.P. (1.980a)  
Endocrinology, 107 (2), 573
- 358.- SIMPKINS, J.W.; KALRA, P.S.; KALRA, S.P. (1.980b)  
Neuroendocrinology, 31, 177
- 359.- SCHNEIDER, H.P.G.; McCANN, S.M. (1.970)  
Endocrinology, 86, 1127
- 360.- SNYDER, S.H. (1.972)  
Arch. Gen. Psychiat., 27, 169
- 361.- SNYDER, S.H. (1.975)  
Neurosci. Res. Prog. Bull., 13, 137
- 362.- SNYDER, S.H.; GREENBERG, D.; YAMAMURA, H. (1.974)  
Arch. Gen. Psychiat., 31, 58
- 363.- SNYDER, S.H.; BENNET, J.P. (1.975)  
Pre and Postsynaptic Receptors. (Usdin, E. and Bunney, W.E. Eds.), 191, Marcel Dekker, New York
- 364.- SOURKES, T.; POIRER, L.; SINGH, S. (1.969)

Third Symposium on Parkinson's Disease. (Gillingham, F.J. and Ronaldson, I.M. Eds.) Livingstone, Edinburgh

- 365.- SRIVASTAVA, M.; KAPOOR, N.K. (1.979)  
Indian J. Exp. Biol., 17 (12), 1413
- 366.- STARKE, K.; TAUBE, H.D.; BOROWSKI, E. (1.977)  
Biochem. Pharmac., 26, 259
- 367.- STEINER, F.A.; PIERI, L.; KAUFMANN, L. (1.968)  
Experientia, 24, 1133
- 368.- STEINER, F.A.; RUF, K.; AKERT, K. (1.969)  
Brain Res., 12, 74
- 369.- STERNBERGER, L.A.; HOFFMAN, G.E. (1.978)  
Neuroendocrinology, 25, 111
- 370.- STOLK, J.M.; NISULA, B.C. (1.975)  
Prog. Brain Res., 42, 47
- 371.- SUZUKI, M.; SHIBASAKY, K. (1.970)  
Endocrinol. Exp., 4, 187
- 372.- SVENSSON, T. (1.971)  
Tesis. Göteborg., 1
- 373.- SWAHN, C.G.; WIESEL, F.A. (1.976)  
J. Neural. Transm., 39, 281
- 374.- TASHJIAN, A.H.; BAROWSKY, N.J.; JENSEN, D.K. (1.971)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 43, 516
- 375.- THIERRY, A.M.; STINUS, L.; BLANC, G.; GLOWINSKI, J.  
(1.973)  
Brain Res., 50, 230
- 376.- THORNBURG, J.E.; MOORE, K.E. (1.976)

In Perinatal pharmacology and therapeutics. (Mirkin, B.L. Ed.), 269 Academic Press. New York

- 377.- UDENFRIEND, S.; ZALTZMAN-NIRENBURG, P.; NAGATSU, T.  
(1.965)  
Biochem. Pharmac., 14, 837
- 378.- ULRICH, R.; SLUSHER, M. (1.964)  
Endocrinology, 75, 483
- 379.- ULRICH, R.; YUWILER, A.; GELLER, E. (1.975)  
Neuroendocrinology, 19, 259
- 380.- UNGERSTEDT, U.; BUTCHER, L.L.; BUTCHER, S.G.; ANDEN, N.E.; FUXE, K. (1.969)  
Brain Res., 14, 461
- 381.- UNGERSTEDT, U. (1.971)  
Acta Physiol. Scand. Suppl., 367, 1
- 382.- UZWYLER, S.; VON WARTBURG, J.P. (1.980)  
Biochem. Pharmac., 29, 3067
- 383.- UZUNOV, P.; WEIS, B. (1.971)  
Neuropharmacol., 10, 697
- 384.- VAN GEIJN, H.P.; ZUSPAN, F.P. (1.979)  
Am. J. Obstet. Gynecol., 135 (6), 743
- 385.- VAN LOON, G.R.; MASCARDO, R.N. (1.975)  
Neurosci. Abstr., 1, 444
- 386.- VAN ROSSUM, J.M. (1.966)  
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 160, 499
- 387.- VEALS, J.W.; KORDUBA, C.A.; SYMCHOWICZ, S. (1.977)  
Europ. J. Pharmacol., 41 (3), 291

- 388.- VERMES, I.; VARSZEGI, M.; TOTH, E.K.; TELEDGY, G.  
(1.979)  
Neuroendocrinology, 28, 386
- 389.- VON VOIGTLANDER, P.F.; MOORE, K.E. (1.973)  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 104, 542
- 390.- WEICK, R.F. (1.978)  
Neuroendocrinology, 26, 108
- 391.- WEINDL, A.; SOFRONIEW, M.V. (1.978)  
Brain-Endocrine Interactions III. S. Karger, Basel.
- 392.- WEINER, R.I.; BLAKE, C.A.; RUBINSTEIN, L.; SAWYER, C.H.  
(1.971)  
Science, 171, 411
- 393.- WEINER, R.I.; GANONG, W.F. (1.972)  
Neuroendocrinology, 9, 65
- 394.- WEINER, R.I.; GANONG, W.F. (1.978)  
Physiol. Rev., 58, 905
- 395.- WELCH, A.S.; WELCH, B.L. (1.969)  
Anal. Biochem., 30 (2), 161
- 396.- WESTERINK, B.H.C.; KORF, I. (1.975)  
Europ. J. Pharmacol., 33, 31
- 397.- WHYBROW, P.C.; PRANG, A.J.J.; TREADWAY, C.R. (1.969)  
Arch. Gen. Psychiat., 20, 48
- 398.- WIESEL, F.A.; FRI, C.G.; SEDWAL, G. (1.973)  
Europ. J. Pharmacol., 23, 104
- 399.- WIESEL, F.A.; FUXE, K.; HOCKFELT, T.; AGNATI, L.F.  
(1.978)  
Brain Res., 148, 399



- 400.- WILK, S.; WATSON, E.; TRAVIS, B. (1.974)  
Pharmacologist, 16, 214
- 401.- WILK, S.; WATSON, E.; GLICK, S.D. (1.975)  
Europ. J. Pharmacol., 30, 117
- 402.- WILSON, W.E.; AGRAWAL, A.K. (1.979)  
Dev. Neurosci., 2, 195
- 403.- WISE, C.D.; STEIN, L. (1.973)  
Science, 181, 344
- 404.- WISE, C.D.; STEIN, L. (1.975)  
Science, 187, 370
- 405.- WISE, C.D.; BELLUZII, J.D.; STEIN, L. (1.977)  
Pharmacol. Biochem. Behav., 7, 549
- 406.- WISE, P.M.; RANCE, N.; BARRACLAUGH, C.A. (1.981)  
Endocrinology, 108, 2186
- 407.- WOLFE, B.B.; HARDEN, T.K.; MOLINOFF, P.B. (1.976)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1343
- 408.- WOODRUFF, G.N. (1.971)  
Comp. Gen. Pharmacol., 2, 439
- 409.- WOODWARD, D.J.; HOFFER, B.J.; SIGGINS, G.R.; BLOOM, F.E.  
(1.971)  
Brain Res., 34, 73
- 410.- WURTMAN, R.J. (1.966)  
Catecholamines. Boston. Little, Brow.
- 411.- WURTMAN, R.J. (1.971)  
Neurosci. Res. Prog. Bull., 9, 172
- 412.- YEN, S.S.C. (1.980)  
Neuroendocrinology. (Krieger, D. and Hughes, J. Eds.)

259, EEUU.

413.- YOUNG, J.M.; HILEY, C.R.; BURGEN, A.S.V. (1.972)

J. Pharm. Pharmac., 24, 9

414.- YOUNG, A.B.; SNYDER, S.H. (1.974)

Molec. Pharmac., 10, 790

415.- YUWILER, A.; GELLER, E. (1.973)

Enzyme, 15, 161

416.- ZANISI, M.; MARTINI, L. (1.975)

Acta Endocr., 78, 683